UNTERSUCHUNGEN ZUR RNS DES CILIATEN STYLONYCHIA MYTILUS

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Artur Heinrich Nock

aus

Bad Peterstal

1979

80 03

UNTERSUCHUNGEN ZUR RNS DES CILIATEN STYLONYCHIA MYTILUS

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Artur Heinrich Nock
aus
Bad Peterstal

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Oktober 1979
Dekan: Prof. Dr. W. Seyffert
1. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Ammermann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. K.G. Grell

Fotodruck H. Resch · Georgstraße 50 · 7402 Kirchentellinsfurt

Für die vielseitige Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. D. Ammermann, Dr. H. J. Lipps und Dr. G. Steinbrück bedanken. Ebenso großen Dank schulde ich den anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung: I. Dahlström, P. Erhardt, Dr. H. Gaude, K.-H. Hellmer, H.-J. Schneider und L. Weyrauch.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	4
2.1. Untersuchungsobjekt und Kulturmethode	4
2.1.1. Radioaktive Markierung der Zellen	4
2.1.2. Actinomycin D-Behandlung	5
2.1.3. Concanavalin A-Behandlung	5
2.2. RNS-Isolierung	5
2.2.1. RNS aus dem Zellplasma	7
2.2.1.1. Gesamt-RNS	7
2.2.1.2. m-RNS aus der Polysomenfraktion	7
2.2.1.3. Poly A^+-m RNS	9
2.2.1.4. r RNS	9
2.2.2. RNS aus Zellkernen	10
2.2.2.1. Zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung	10
2.2.2.2. Für Hybridisierungsexperimente	11
2.3. RNS-Reinigung	12
2.4. Trennmethoden	12
2.4.1. Säulenchromatographie	12
2.4.1.1. Sephadex-Säulen	12
2.4.1.2. Oligo (dT)-Cellulose/Poly U-Sepharose-Säulen	13
2.4.1.3. Hydroxyapatit-Säulen	13
2.4.2. Gradientenzentrifugation	14
2.4.2.1. Saccharosegradient	14
2.4.2.2. CsCl-Gradient	15
2.4.3. Elektrophoresen	15
2.4.3.1. Polyacrylamid-Gele	15
2.4.3.2. Formamid-Polyacrylamid-Gele	16
2.4.3.3. Polyacrylamid-Laemmli-Gele	16
2.4.3.4. Agarose-Gele	16
2.5. RNS-Markierung mit ^{32}P	17
2.6. Nick-Translation	17

Seite

2.7. Southern-Transfer 18
2.8. In vitro-Translationsexperimente 18
2.9. Hybridisierungsexperimente 19
2.9.1. Hybridisierungsexperimente mit nick-translatierter DNS 19
2.9.2. Filterhybridisierung mit jodierter RNS 20
2.10. Auftrennung der Gesamtproteine 21
2.11. Radioaktivitätsnachweis 21
2.11.1. Szintillationsmessung 21
2.11.2. Fluorographie 22
2.11.3. Autoradiographie 22
2.12. Analytische Methoden 23

3. Ergebnisse 24
3.1. Isolierung der RNS 24
3.1.1. Gesamt-RNS aus ganzen Zellen 25
3.1.2. Plasma-RNS 27
3.1.3. Poly A^+-Plasma-RNS 29
3.1.4. Polysomen und polysomale Untereinheiten 32
3.1.5. RNS aus Polysomen 35
3.1.5.1. m RNS 35
3.1.5.2. r RNS 36
3.1.6. Kern-RNS 37
3.2. Molekulargewichtsvergleich von Kern- und Plasma-RNS 38
3.3. Sättigungshybridisierung im RNS-Excess 42
3.4. Unterschiede im Proteinmuster von unbehandelten- und Con A-Zellen 46
3.5. Translation von "Con A-RNS" im Reticulocytensystem (RCS) 47
3.6. Filterhybridisierung mit polysomaler RNS aus n-und Con A-Zellen 49

4. Diskussion 52
5. Zusammenfassung 61
6. Abkürzungen 63
7. Literaturverzeichnis 66

1. Einleitung

Untersuchungen am Chromatin und an der DNS von Stylonychia mytilus führten zu bemerkenswerten Ergebnissen. Sie zeigen, daß diese Ciliatenzelle vorteilhafte Eigenschaften besitzt, wenn man die Organisation des Genoms bzw. seine Regulation und Expression untersuchen möchte.

So eignet sich dieser Organismus z.B. auf Grund des bei Ciliaten allgemein verbreiteten Kerndimorphismus besonders für Untersuchungen an Regulationsprozessen der DNS-Templateaktivität (RIEWE, 1979), da diese Zellen jeweils zwei getrennte, in ihrer Aktivität sehr verschiedene Genome besitzen (AMMERMANN, 1965; AMMERMANN et al. 1974). Ähnliches gilt für Untersuchungen über die Funktion der repetitiven DNS-Sequenzen, die zwar wie in den meisten eukaryontischen Genomen auch bei Stylonychia vorhanden sind, hier aber nur im größtenteils inaktiven Mikronucleus vorkommen. Im syntheseaktiven Makronucleus hingegen lassen sich, außer bei der r DNS, keine weiteren repetitiven Sequenzen nachweisen (STEINBRÜCK, 1976).

Insbesondere jedoch ist der Organismus durch zwei Eigenschaften des Makronucleusgenoms ausgezeichnet: Zum einen ist nämlich die Komplexität dieses Genoms stark reduziert und beträgt nur noch 2% des ihm zugrunde liegenden Mikronucleusgenoms, d.h. es ist nur 12 mal größer als das Genom von E. coli, und zum anderen liegen sowohl die DNS als auch das Chromatin dieses Makronucleus in "gene sized pieces" vor (ELSEVIER et al. 1978; LIPPS et al., 1978). Beide Eigenschaften zusammen zeigen deutlich die Vorteile, die dieses Genom hinsichtlich der Untersuchung seiner Genorganisation und Genregulation bietet.

Da die Zellen auch ohne Mikronucleus voll lebensfähig sind, können, abgesehen von den meiotischen Vorgängen, offensichtlich alle Zellfunktionen vom Makronucleus gesteuert werden

(AMMERMANN et al. 1974), obwohl seine Komplexität, wie schon erwähnt, stark reduziert ist. Es liegt daher die Vermutung nahe, daß dieses Makronucleusgenom, verglichen mit anderen eukaryontischen Genomen zu einem höheren Prozentsatz aktiv ist. Diese Vermutung nachzuprüfen, ist e i n Ziel der vorliegenden Arbeit.

Eine weitere Aufgabe besteht darin, zu klären, ob sich die Komplexität von Kern- und m RNS so stark unterscheidet, wie dies von vielen höheren Eukaryonten bekannt ist, oder ob die diesbezüglichen Verhältnisse im Makronucleusgenom von Stylonchia eher denen niederer Eukaryonten gleichen. Bei höheren Pflanzen (Nicotiana tabacum z.B.) ist nämlich die Kern-RNS ca. 3,6 mal komplexer als die m RNS (GOLDBERG et al., 1978). Bei tierischen Zellen ist der Unterschied zwischen 4 und mehr als 10 mal größer (so z.B. bei Seeigelzellen (Strongylocentrotus), HOUGH et al. (1975); bei Drosophilazellen, LEVY et al. (1976); bei Maus-Friend-Zellen, Kleiman et al. (1977)). Er kann sogar für einzelne RNS-Species bei Säugerzellen auf das 50fache ansteigen (PERRY et al., 1975). Andererseits unterscheiden sich Kern- und Plasma-RNS hinsichtlich ihrer Komplexität bei Dictyostelium nur noch um den Faktor 2,3 (FIRTEL und JACOBSON, 1977) und in Hefezellen bzw. in den Zellen des Phycomyceten Achlya sind schließlich die Komplexitäten von Kern- und Plasma-RNS sogar identisch. (HEREFORD und ROSBASH, 1977 bzw. TIMBERLAKE et al., 1977)

Der Vergleich der RNS-Komplexitäten bei Stylonychia wird mit Hilfe von Sättigungshybridisierungen durchgeführt, wobei die jeweilige RNS im Excess an markierte Makronucleus-DNS hybridisiert wird. Nach Beendigung der Reaktion wird der DNS-Anteil in den DNS/RNS-Hybriden als Maß für die RNS-Komplexität ermittelt.

Um auch die Frage nach der Anzahl der Gene bei Stylonychia beantworten zu können, wird außerdem das mittlere Molekulargewicht der Plasma-RNS bestimmt. Eine elektrophoretische

Darstellung der Kern-RNS von Stylonychia soll schließlich einen Molekulargewichtsvergleich mit der entsprechenden RNS anderer Eukaryonten ermöglichen und zugleich zeigen, ob die Werte des vermuteten ribosomalen RNS-Precursors mit den schon bekannten DNS-Daten übereinstimmen (vergl. LIPPS und STEINBRÜCK, 1978).

Der Makronucleus von Stylonychia bietet weiterhin noch die günstige Gelegenheit, die - möglicherweise koordinierte - Regulation mehrerer Gene zu untersuchen. Denn offensichtlich enthält die RNS,welche aus Zellen isoliert wurde, die mit Concanavalin A behandelt waren, Sequenzen spezifischer Gene, die in unbehandelten Zellen nicht oder nur in sehr geringem Umfang transkribiert werden (vergl. KNOWLES et al., 1978).

Im letzten Teil dieser Arbeit wird deshalb versucht, das Vorhandensein dieser spezifischen RNS-Sequenzen in der Gesamt-m RNS von Concanavalin A-behandelten Stylonychiazellen zu erhärten,und ebenso wird der Versuch unternommen, mit Hilfe dieser spezifischen RNS-Sequenzen in Filterhybridisierungsexperimenten die zugehörigen Gene bzw. die ihnen zugrunde liegende DNS zu lokalisieren. Nach einem positiven Verlauf dieser Experimente müßte es zukünftig dann möglich sein, einzelne Gene oder ihre DNS für weitere Detailuntersuchungen hinsichtlich der Regulation, anzureichern und zu isolieren, zumal, wie oben schon erwähnt, sowohl das Chromatin wie auch die DNS in "gene sized pieces" vorliegen.

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchungsobjekt und Kulturmethode

Alle Versuche dieser Arbeit wurden an dem hypotrichen Ciliaten Stylonychia mytilus, Syngen I (AMMERMANN, 1965) durchgeführt.

Die Tiere wurden in Plastik-Petrischalen mit Pringsheim-Lösung gehalten (0,85mM $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 0,35mM KCl, 0,08mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,11mM $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, mit HCl auf pH 6,8 eingestellt).

Als Futterorganismus diente Chlorogonium elongatum (AMMERMANN et al., 1974). Um die Anzahl der Bakterien, die im Kulturmedium und in den Zellen selbst vorhanden sind, zu vermindern, wurde dem Futter jeweils 2 Tage vor Versuchsbeginn Penicillin G, Na/K-Salz (Hoechst) zugegeben (Endkonzentration in der Kultur: 0,1mg/ml; Stylonychia-Kulturen verhalten sich auch bei einer Penicillin-Konzentration von 0,5mg/ml über Wochen normal (AMMERMANN, mündl. Mitteilung).

2.1.1. Radioaktive Markierung der Zellen

Damit man die Menge an radioaktiven Verbindungen möglichst niedrig ansetzen konnte, wurden die Zellen für die Dauer der Markierung konzentriert; d.h. die Zellen von 10 Petrischalen wurden auf einer Polyamid-Gaze mit 30 µm Maschenweite (AMMERMANN et al., 1974) gesammelt und mit einem definierten Volumen (25ml) Pringsheim-Lösung in eine neue Petrischale gespült. Die radioaktiven Verbindungen ((5,6 - ^3H) - Uridin, 40-60 Ci/mmol; (2- ^3H)-Adenosin, 20-25 Ci/mmol; L-(^{35}S)-Methionin, 40 - 500 mCi/mmol; von Amersham Buchler) wurden dann direkt dem Kulturmedium zugefügt (genaue Daten s. 2.2. und 2.10.).

2.1.2. Actinomycin D - Behandlung

Zur Hemmung der r - RNS - Synthese wurden die Kulturen 20 h vor der Ernte mit einer Actinomycin-D-Lösung (1mg/ml in H_2O; Serva) versetzt. Die Konzentration in der Kultur betrug 1µg/ml. 4 h vor der Ernte wurden die Zellen unter Beibehaltung der Actinomycin - D - Konzentration für die radioaktive Markierung konzentriert (s. 2.1.1.).

2.1.3. Concanavalin* - Behandlung

Die für die Veränderungen in der Pellicula benötigte Con A-Konzentration (FRISCH et al., 1976) hängt stark von der Zellkonzentration und vom allgemeinen Zustand der Kulturen ab. Die Wirkung der zugefügten Con A-Menge wurde deshalb im Binokular verfolgt und betrug im Normalfall 4,3 - 6,5µg/ml. Verwendet wurde eine Con A-Stammlösung von 4,3mg/ml in 0,5M NaCl. Die Zellkulturen wurden unmittelbar vor den Versuchen konzentriert (s. 2.1.1.).

2.2. RNS - Isolierung

Vor jeder Isolierung wurde sichergestellt, daß die Kulturen frei von Futterorganismen waren. Falls die RNS markiert werden sollte, wurden die vorkonzentrierten Zellen (s. 2.1.1.) 3 - 4 h mit ^{3}H-Uridin bzw. ^{3}H-Adenosin versetzt (10 µCi/ml), danach wurden je 2 - 3 dieser Schalen auf einer Polyamidgaze gesammelt und mit 20ml niederionigem Puffer A (0,35mM KCl, 0,11mM $Na_2PO_4 \cdot 2H_2O$; pH 6,8) in kalibrierte "Erdöl-Zentrifugengläser" (Erdölprüfer, 3113, Heraeus Christ) gespült. Bei vorsichtiger Zentrifugation (500 rpm; Labofuge II, Hereaus Christ) war die Zelldichte nach 30 sec. in den unteren 2,5ml so hoch, daß man ohne allzugroße Verluste den Rest verwerfen konnte (routinemäßige mikroskopische Kon-

---

* Concanavalin A (Con A) wurde freundlicherweise von Dr. W.G. Bessler, Inst. für Mikrobiologie II, Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt.

trolle!). Je 5ml der relativ dichten Zellsuspension wurden möglichst schnell in einen eisgekühlten Dounce-Homogenisator (50ml) mit 7ml vorgekühltem Puffer B gegeben und von Hand homogenisiert. Die Homogenisations- und Extraktionsbedingungen wurden im wesentlichen von PENMAN (1969), SCHERRER (1969) und KIRBY (1968) entnommen. (Puffer B: 0,86M NaCl; 86mM $MgCl_2$; 17,5mM Tris; 0,28% SDS; 5,2% NaAS; pH 8,5; mit redestilliertem Phenol gesättigt).

Vor der Extraktion mit Phenol (H_2O gesättigt)/Chloroform (1:1) wurde der wässrigen Phase EDTA zugegeben (EK: 10mM). Insgesamt wurde sie 3x bei 25°C mit jeweils frischem Phenol/Chloroform extrahiert. Die 1. Inter- und 1. Phenolphase wurden 1x bei 65°C mit 1 Vol 1x Homogenisationspuffer reextrahiert und anschließend - zusammen mit der ersten wässrigen Phase - 2x bei 25°C extrahiert. Nach zweimaliger Chloroform-Extraktion wurde NaAc (EK: 0,2M) zugegeben und die Nucleinsäuren mit 2,5 Vol Aethanol bei -20°C über Nacht gefällt. Die Zentrifugationsschritte erfolgten jeweils bei 0°C.

Wenn in den nachfolgenden Experimenten die DNS-Kontamination störte, wurde der Niederschlag pelletiert, mit 1 Vol. LSB-Puffer (0,1M NaCl, 50mM $MgCl_2$, 10mM Tris, pH 7,6) und 50 - 150µg DNase/ml versetzt und 15 - 20 Min. bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zufügen von 10%iger SDS-Lösung (bis 0,1%) und 500µg Proteinase-K/ml (30Min bei 37°C vorinkubiert) gestoppt. Nach weiteren 20Min (bei 37°C) wurde 1x mit Phenol/Chloroform extrahiert und die RNS von den Oligo-Nucleotiden und niedermolekularen Verunreinigungen über einer Sephadex-G-50-Säule (1,6x 85 cm; mit LSB-Puffer äquilibriert) abgetrennt. Der Ausschlußpeak wurde gesammelt, NaAc (EK: 0,2M) zugesetzt und mit Aethanol gefällt (s.o.).

2.2.1. RNS aus dem Zellplasma

Bei allen Plasma-RNS-Präparationen trat das Problem auf, daß dieses RNS mit DNS und Kern-RNS verunreinigt war. Um diese Verunreinigung zu vermeiden, wurden die Kerne sofort nach der Lyse der Zellen pelletiert. Die RNS wurde dann aus dem kernfreien Überstand extrahiert (2.2.).

2.2.1.1. Gesamt - RNS

Je 2ml Zellkonzentrat wurden zu 2ml eisgekühltem Puffer C gegeben und im Eisbad 2 - 3 Min. gerührt (Magnetrührer). (Puffer C: 20mM Tris (pH7,6), 4% PVP (nach LEE, 1966), 50µg Heparin/ml, 0,2mg Spermidinphosphat/ml, 0,1% Triton X - 100, 0,1M Sucrose. Anstelle von Triton X - 100 wurde in einigen Experimenten 0,4% Nonidet P 40 verwendet (POUSADA, 1975)). Die Kerne und die groben Zellfragmente wurden pelletriert (3 Min.; 800g), dem Überstand 1,4 Vol Puffer B (s. 2.2.) zugefügt, die RNS nach 2.2. extrahiert und gereinigt.

2.2.1.2. m-RNS aus der Polysomenfraktion

Für die Polysomengewinnung wurde der Homogenisationspuffer modifiziert: Puffer D: 100mM Tris (pH 7,8); 240mM KCl; 37,5mM $MgCl_2$;0,15% Triton X 100; 110µg PVS/ml; 0,3mg Cycloheximid/ml; 0,2µl 2-Mercaptoaethanol/ml. (nach: MARTIN, 1969; JOST, 1976; GALAU, 1974). Der mit 2 Volumina H_2O verdünnte Puffer D wird im folgenden als Polysomenpuffer bezeichnet.
3ml der konzentrierten Zellsuspension (2.2.) wurden im Dounce-Homogenisator mit 1,5ml eiskaltem Puffer D vorsichtig homogenisiert (ca. 3 Stöße), die Triton X 100 - Konzentration dann auf 0,5% erhöht und die Kerne 3 Min. bei 1000g pelletiert. Der Überstand wurde mit 20µg Heparin/ml versetzt, 5 Min. bei 0°C gerührt und anschließend 15 Min. mit 10 000g (1°C; A 8.24-Rotor, Vetter) zentrifugiert.

a) Um die Güte der Polysomenpräparation zu testen, wurden 0,1 - 0,5ml (15 - 75 OD) auf einen Saccharose-Gradienten (36ml, 15-30%, in Polysomenpuffer mit 50µg/ml Heparin,

ohne PVS) geschichtet und 2,5 h mit 27 000 rpm (SW 27, Beckman L 5 • 65) bei 1°C zentrifugiert. Der Gradient wurde dann in 0,7ml-Portionen fraktioniert (LKB-Fraktionssammler Ultrorac 7000) und die Absorption bei 260 bzw. 280nm entweder gleichzeitig (mit dem Durchflußphotometer von Gilson: Spectrochrom M) oder später von Hand am Photometer (Zeiss: PM 6) gemessen.

Die Polysomenfraktionen (außer Monosomen) wurden gesammelt, mit 1 Vol. Polysomenpuffer verdünnt und 3 h mit 40 000 rpm (SW 41, Beckman L 5 • 65) zentrifugiert. Das Pellet wurde gelöst (in 10mM Tris pH 7,8; 50µg Heparin/ml), mit 1,4 Vol. Puffer B versetzt und die RNS extrahiert (2.2.).

b) Mit weniger Aufwand wurde höher angereicherte m RNS erhalten, wenn man den 10 000g-Überstand mit 1x Polysomenpuffer verdünnt, davon je 9,5ml über 3ml 10%iger Saccharose (in Polysomenpuffer) schichtete und im SW 41-Rotor (Beckman L 5 • 65) 2 h bei 1°C mit 37 000 rpm zentrifugierte. Das Pellet (im wesentlichen Polysomen) wurde in Puffer E (10mM Tris, pH7,4; 0,5mM $MgCl_2$, 35µg PVS/ml) gelöst und 1,5 - 2 h gegen ca. 300 Vol. Puffer E mit 0,7mM K^+EDTA bei 0°C dialysiert (vergl. PARTHIER, 1974). Je 3ml des Dialysats wurden dann auf 2ml 10% Saccharose in Puffer E geschichtet und im SW 65-Rotor (Beckman L 5 .65) 2 h bei 1°C mit 53 000 rpm zentrifugiert (im Pellet: ribosomale Untereinheiten). Der Überstand wurde mit 1,4 Vol. Puffer B versetzt und die so angereicherte m RNS nach 2.2. extrahiert (ohne Reextraktion der nur geringen Interphase).

Das Pellet löste man in 10mM Tris pH 7,8; 50µg/ml Heparin, gab 1,4 Vol. Puffer B hinzu und extrahierte nach 2.2. die r RNS aus den ribosomalen Untereinheiten.

2.2.1.3. Poly A^+ - m RNS

Die nach 2.2.1.1. isolierte Plasma-RNS wurde in 1:50 verdünntem Bindungspuffer (BP) gelöst, mit 5x BP auf 1x BP eingestellt (0,5M NaCl; 40mM Tris/HCl, pH 7,6; 8mM EDTA; 20%FA), mit einer Konzentration von 1mg/ml bei 10°C auf eine Oligo dT-Cellulose-bzw. Poly U-Sepharose-Säule (2.4.1.2.) aufgetragen und mit 1x BP gewaschen (im wesentlichen nach Arbeiten von AVIV (1972), WASILEWSKA (1976) bzw. LINDBERG (1972) und JOST (1976)). Die nicht absorbierte RNS wurde noch zweimal unter denselben Bedingungen über die Säule gegeben und mit 1x BP gewaschen, bis die Absorption (260nm) des Puffers nach der Säule und bei 20°C = 0,05 war. Eluiert wurde bei 45°C mit 10mM Tris · HCl, pH 7,6 und 50% FA.

Um den Anteil der unspezifisch gebundenen RNS zu vermindern, wurde das Eluat wieder auf 1x BP eingestellt und an einer 2. Säule rechromatographiert.

Die Fraktionen der nicht absorbierten (r-und Poly A^- -)RNS wurden direkt mit 2,5 Vol. Aethanol und die der eluierten (Poly A^+ -)RNS nach Zugabe von NaAc (EK: 0,2M) und E. coli-t RNS (50µg/ml) bei -20°C gefällt.

Für die Größenbestimmung des Poly-A-Stückes war die RNS mit ^{3}H-Adenosin markiert (2.2.). Die isolierte Poly A^+-RNS wurde pelletiert, gelöst (in: 0,2M NaCl, 10mM Tris/HCl, 10mM EDTA, pH7) und mit 100 E Ribonuclease T_1/ml und 50µg Ribonuclease A/ml für 45 Min. bei 37°C inkubiert. Beendet wurde die Reaktion durch Zugabe von 1/5 Vol. 5x Loening-Probepuffer und Auftrennung der RNS auf einem 10%igen PAA-Gel (zusammen mit E. coli-t RNS und 5 S-RNS).

2.2.1.4. r - RNS

Gereinigte r-RNS wurde entweder aus den pelletierten Ribosomen der Monosomenfraktion (2.2.1.2.a) oder aus den riboso-

malen Untereinheiten (2.2.1.2.b) gewonnen, indem diese in LSB-Puffer gelöst, mit Proteinase K inkubiert und mit Phenol/Chloroform extrahiert wurden (2.2.). Für die weitere Auftrennung löste man die r-RNS in 1:2 verdünntem Puffer D (ohne Triton X 100 und Cycloheximid) mit EDTA (20mM), schichtete jeweils 10 - 15 OD (Vol.: 150 - 200µl) auf einen 12 - 30%igen Saccharose-Gradienten (15ml, im obigen Puffer) und zentrifugierte im SW 27.1 - Rotor 15 h mit 26 000 rpm (Beckman L 5 · 65) bei 5°C. Fraktioniert wurde automatisch (380µl Fraktionen; Ultrorac 2000), und die Extinktion entweder während der Fraktionierung (mit dem Spectrochrom M von Gilson) oder im Anschluß daran von Hand (Zeiss: PM 6) gemessen. Die Fraktionen des 5S, 17S und 26S-Peaks wurden getrennt gepoolt, mit NaAc (EK: 0,2M) versetzt und mit je 2,5 Vol. Aethanol bei -25°C gefällt.

2.2.2. RNS aus Zellkernen

Je nach Verwendungszweck der RNS wurden die Kerne auf unterschiedliche Weise isoliert:

2.2.2.1. Zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung

Um das Molekulargewicht der Kern-RNS mit dem der Plasma-RNS vergleichen zu können, wurden beide RNS-Spezies aus denselben Zellen (von ca. 30 Kulturschalen) isoliert. Damit eine Degradation weitgehend verhindert wurde, mußte möglichst bakterienfrei (2.1.), bei niedriger Temperatur (auf Eis) und schnell gearbeitet werden. Für die Plasma-RNS-Isolierung sollte das Extraktionsvolumen nicht zu groß werden, weshalb die Zellen wie unter 2.2. konzentriert wurden. Die Lyse erfolgte nach 2.2.1.1. (mit doppelter Heparin-Konzentration). Nachdem die Kerne pelletiert waren, wurde der Überstand mit 1,4 Vol. Puffer B versetzt und die Plasma-RNS extrahiert (2.2.). Die pelletierten Kerne wurden in 5ml eiskaltem, 1:1 verdünntem Puffer C (doppelte Heparin-Konzentration, ohne Triton X 100) aufgenommen, 2 - 3 Min. gerührt, durch 10ml 1,4M

Saccharose-Lösung (im selben Puffer) zentrifugiert (10 Min., 1000 g) und wieder in (modifiziertem) Puffer C aufgenommen. Anschließend wurden sie über einer Nickel-Gaze (AMMERMANN, 1974) mit 10-15ml desselben Puffers (eiskalt, ohne Saccharose) gewaschen, nochmals (wie oben) durch Saccharose-Lösung zentrifugiert und schließlich in 1,5-2ml Puffer suspendiert. Davon wurden 600µl 2 Min. mit 1000g zentrifugiert, der Rest mit 2ml Puffer verdünnt und nach 2.2. extrahiert. Das Kern-Pellet (aus den 600µl) wurde in 30µl 10mM Tris (pH 7,4), 2,5mg Proteinase-K/ml, 0,2% SDS bei 37°C aufgenommen und nach 15 Min. mit 170µl deionisiertem FA (pH 7,4) versetzt. (FA-Endkonzentration ca. 85%). Nach Zugabe von Glycerin (5%) und Bromphenolblau (0,05%) wurden Aliquots auf FA-PAA-Gele aufgetragen und die Molekulargewichtsverteilung elektrophoretisch bestimmt (2.12.c).

2.2.2.2. Für Hybridisierungsexperimente

Die Zellen wurden bei 0°C lysiert, indem die Polyamid-Gazen (2.1.1.) mit Zellen von je 10 Kulturschalen direkt in 50ml Puffer C (2.2.1.1.; 1:1 mit H_2O verdünnt) getaucht wurden. Nach 2-3 Min. blieben nur noch die groben Zellrückstände auf der Gaze zurück. Nach Lyse aller Zellen wurden die Kerne aus dem Lysiermedium pelletiert und wie unter 2.2.2.1. weiter gereinigt. Aus den gereinigten Kernen wurde nach Zugabe von 1,4 Vol. Puffer B die Nucleinsäuren isoliert (2.2.). Nach der Aethanolfällung wurde das Pellet in 10ml 10mM Tris/HCl (pH 7,0) gelöst und Ungelöstes pelletiert (10 Min., 3000g). Aus dem Überstand wurden in einem CsCl-Gradienten (2.4.2.2.) DNS und RNS aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte separiert und getrennt ausgefällt. Um die RNS von DNS-Kontaminationen zu befreien, wurde sie wie unter 2.2. mit DNase bzw. Proteinase K behandelt, über einer Sephadex-G-50 Säule weiter gereinigt und mit Aethanol gefällt.

2.3. RNS - Reinigung

Routinemäßig wurde die extrahierte RNS einer DNase- und Proteinase-K-Behandlung unterzogen. Nach erneuter Phenol/Chloroform-Extraktion erfolgte die weitere Reinigung über einer Sephadex G-50-Säule (2.2.). Im Anschluß daran wurde die RNS gefällt und unter Alkohol bei -20°C aufbewahrt. Bedarfsweise wurde die RNS vor oder nach der Alkoholfällung gegen geeignete Puffer bei 0°C dialysiert. (Die Dialyseschläuche waren mit 1%iger Essigsäure (1 h) bzw. mit 1% Na_2CO_3, 1mM EDTA-Lösung unter mehrmaligem Aufkochen vorbehandelt). In einigen Fällen erfolgte nach der letzten Phenol-Chloroform-Extraktion (hauptsächlich) zur Entfernung von Polysacchariden und Proteinspuren eine Reinigung durch Umsalzung der RNS in wasserunlösliche CTA-Salze (BELLAMY, 1968).

2.4. Trennmethoden

2.4.1. Säulenchromatographie

2.4.1.1. Sephadex-Säulen

Sie wurden - wie unter 2.2. schon erwähnt - zur Abtrennung von niedermolekularen Verunreinigungen und störenden Salzen benützt. Normalerweise wurde Sephadex-G-50 in einem Vol. von 170ml in einer 1,6cm x 100cm Säule (Pharmacia) verwendet.

Die Vorbereitung des Säulenmaterials erfolgte nach Angaben des Herstellers (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden). Das Ausschlußvolumen der Säule betrug 47ml (bestimmt mit 0,3ml Dextran-Blau-Lösung, MG $2 \cdot 10^6$ D). Die RNS-Lösung wurde in möglichst geringem Vol. (max. 1-1,5ml) aufgetragen; die Durchflußgeschwindigkeit betrug meist 1ml/Min.. Die optische Dichte wurde automatisch (Gilson, Spectrochrom M) bei 260nm registriert, fraktioniert wurde mit dem Ultrorac 2000 (LKB). Die Fraktionen des Ausschlußpeaks wurden gesammelt, mit NaAc (EK: 0,2M) versetzt und die gereinigte RNS mit 2,5 Vol. Aethanol bei -20°C ausgefällt (und so aufbewahrt).

2.4.1.2. Oligo (dT)-Cellulose/Poly U-Sepharose-Säulen

Oligo (dT)-Cellulose wurde von Collaborative Research Inc. (Waltham, Mass., USA) und Poly (U)-Sepharose von Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Schweden) bezogen. Die Präparation für die Chromatographie erfolgte jeweils nach Angaben der Hersteller. Die Säulenvolumina betrugen in beiden Fällen ca. 1ml (in 5ml Pipetten bzw. K9/15 Pharmacia-Säulen). Beide Säulen wurden mehrfach benutzt, wobei die Oligo (dT)-Cellulose mit 0,1M Na/KOH regeneriert und unter einigen Tropfen Chloroform gelagert wurde, während die Poly (U)-Sepharose mit 10-15 Vol. 90% FA (10ml/Tris/HCl, pH 7,6) eluiert und unter 0,1% NaN_3 in 0,9% NaCl aufbewahrt wurde. Nach Äquilibrierung mit 1x BP konnten beide Säulen entsprechend 2.2.1.3. benutzt werden. Das Volumen der Fraktionen betrug 0,5ml. Der Waschvorgang nach Auftrag der Proben bzw. die Elution wurde anhand der Extinktionsmessung verfolgt.

2.4.1.3. Hydroxyapatit - Säulen (HAP)

RNS/DNS- bzw. DNS/DNS-Doppelstränge wurden von RNS bzw. DNS-Einzelsträngen an HAP-Säulen voneinander getrennt (BERNARDI, 1965; GALAU et al., 1974). HAP (DNA Grade Bio Gel HTP) wurde von Bio-Rad Laboratories (Richmond, Calif.) bezogen und nach Angaben des Herstellers präpariert. Säulen von je 1ml wurden in Pasteur-Pipetten gefüllt (mit silikonisierter Glaswolle ausgelegt), von denen sich jeweils 5 in einer temperierbaren Kunststoffküvette befanden. Die Absorptionschromatographie wurde bei 60°C durchgeführt, nachdem die Säulen mit 0,12M Phosphatpuffer (pH 7,0; der Brechungsindex wurde kontrolliert) äquilibriert waren. Nach Auftrag der Probe (0,5-0,8ml) wurde mit 4x1ml 0,12M Phosphatpuffer gewaschen und anschließend die Doppelstränge mit 4x1ml 0,4M Phosphatpuffer (pH 7,0) eluiert. Die Durchflußrate betrug ca. 0,2ml/Min.

Nachdem alle Fraktionen (ausgewaschene und eluierte) auf gleiches Volumen (3,33ml) und gleiche Phosphatpuffer-Konzen-

tration (0,12M) gebracht worden waren, wurden 12ml Aqualuma (Seromed, München) zugesetzt, gemischt und nach einigen Stunden die Radioaktivität registriert. Um die unspezifische Bindung möglichst gering zu halten, wurde jede Säule vor der endgültigen Äquilibrierung mit 5µg E. coli-DNS (in 0,12M Phosphatpuffer) beschickt.

1ml Säule entspricht ca. 0,4g trockenem HAP-Pulver und bindet nach Angaben des Herstellers maximal 400µg Kalbsthymus-DNS. Die HAP-Säulen wurden nur einmal benutzt.

2.4.2. Gradientenzentrifugation

2.4.2.1. Saccharosegradienten

Sie dienten zur Auftrennung und Reinigung von Polysomen, ribosomalen Untereinheiten und r RNS. Es wurden in allen Fällen routinemäßig lineare Gradienten benutzt, die automatisch mit dem Mixograd von Gilson bei der späteren Gebrauchstemperatur gemischt wurden.

Die Saccharose (Merck, 7653) wurde als 60%ige Lösung (in H_2O quarz-dest.) 20 Min. bei 120°C autoklaviert, abgekühlt, mit dem entsprechenden Puffer gemischt und dann benutzt. Zentrifugiert wurden die Gradienten in Polyallomertubes (Beckman) und in den SW-Rotoren: 27; 27.1 und 41; Zentrifugenauslauf ohne Bremse.

Die automatische Fraktionierung wurde mit dem Fraction Recovery System (Beckman) durchgeführt, wobei die tubes in allen Fällen am Boden angestochen und abgepumpt wurden (OD-Registrierung mit dem Durchflußphotometer Spectrochrom M von Gilson).

Die Linearität des Gradienten wurde durch Brechungsindexmessung (Refraktometer, Zeiss) überprüft.

2.4.2.2. CsCl - Gradienten

Dieselben CsCl-Gradienten, die zur Reinigung der DNS dienten, wurden gleichzeitig zur Abtrennung der RNS von der DNS benutzt. Das DNS/RNS-Gemisch wurde in 10mM Tris/HCl (pH 7,0) gelöst (10ml) und so mit einer CsCl-Lösung (in 10mM Tris/HCl; CsCl: Merck, Suprapur) gemischt, daß in einem Endvolumen von 60ml der Brechungsindex bei 25°C 1,3994 (entsprechend einer Dichte von 1,7g/cm^3) betrug. Je 10ml dieser Lösung mit max. 350µg DNS/RNS wurden in Ti-50-tubes (Beckman) mit dünnflüssigem Paraffin überschichtet und 90 h mit 40 000 rpm bei 25°C zentrifugiert. Nachdem das Paraffin vorsichtig abpipettiert und die Wandung getrocknet war, wurde analog zu den Saccharose-Gradienten fraktioniert (0,45ml Fraktionen). Da ein Teil der RNS pelletierte, wurde das Pellet vom Boden der Röhrchen mit Tris/HCl-Puffer gelöst und zusammen mit den 4 oder 5 Grundfraktionen (1:2 verdünnt) nach Zugabe von NaAc (EK: 0,2M) mit Aethanol gefällt. Die DNS-Fraktionen wurden getrennt gefällt.

2.4.3. Elektrophoresen

2.4.3.1. Polyacrylamid - Gele

Normalerweise wurde die RNS auf 2,4%igen, das Poly A-Fragment der m-RNS auf 10%igen PAA-Gelen aufgetrennt (LOENING, 1966; RICHARDS and GRATZER, 1968). Die Elektrophorese wurde mit konstanter Stromstärke (5mA/Gel) über die jeweils angegebene Zeitdauer (bei Zimmertemperatur) durchgeführt. Aufgetragen wurden normalerweise 10-40µg Nucleinsäuren in 20-50µl. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele bei 265nm gescannt (Joyce Loebl Scann 400) und bei -20° bzw. -70°C eingefroren. Um die Radioaktivitäts-Verteilung bestimmen zu können, wurden die gefrorenen Gele in 1mm-Scheiben geschnitten (Joyce Loebl Gel-Slicer) und in Scintillationsgefäßen eluiert (2.11.1.).

2.4.3.2. Formamid - Polyacrylamid - Gele

Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde die RNS unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Die FA-PAA-Gele waren nach JOST and PEHLING (1976) präpariert: 3,4% PAA, 99% FA. Die Elektrophorese wurde bei 5°C mit 110 V über 15 h durchgeführt. Der Phosphatpuffer (20mM; pH 7,5) wurde ständig umgepumpt. Im Anschluß an die Elektrophorese wurden die Gele 4 h unter leichter Bewegung in einem Eisessig-, Methanol-, H_2O-Gemisch (1: 3,3: 9) gelagert, dann eingefroren (-70°C) und wie PAA-Gele geschnitten bzw. eluiert.

2.4.3.3. Polyacrylamid - Laemmli - Gele

Gesamt-Proteine von Stylonychia bzw. die im RCS synthetisierten Proteine wurden auf 12,5%igen PAA-Flachgelen (1mm) nach LAEMMLI (1970) aufgetrennt. 5 - max. 15µl der vorbereiteten Proben (s. 2.10. und 2.8.) wurden aufgetragen und bei 20V ca. 15 h bei Zimmertemperatur getrennt. Bei Bedarf wurden die Gele mit Coomassie brilliant blue (0,25%) in H_2O (5): Methanol (5): Eisessig(1) 1-2 h gefärbt und 2-3 h entfärbt (mehrmaliger Wechsel in: 10% Eisessig, 30% Methanol). Nach Auftrennung radioaktiver Proben wurde anschließend eine Fluorographie bzw. Autoradiographie durchgeführt (2.11.2. bzw. 2. 11.3.).

2.4.3.4. Agarose - Gele

Die DNS wurde auf 2mm-Agarose-Flachgelen (SCHAFFNER et al. 1976), die nach HAYWARD and SMITH (1972) präpariert waren, getrennt. Normalerweise betrugen die Agarose-Konzentration 0,7%, die Spannung 40V (ca. 3V/cm) und die Elektrophoresedauer 4-5 h (bei Zimmertemperatur). Als Elektrophoresepuffer diente der Tris-Phosphat-Puffer von LOENING (1969) ohne SDS. Die DNS wurden in Loening-Puffer gelöst, mit einer Agarose-Suspension (SCHAFFNER et al. 1976) vermischt und in Mengen von je 5-10 µg (5-10µl) aufgetragen.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit Ethidiumbromid (1µg/ml in Loening-Puffer) 30-60 Min. gefärbt, kurz mit H_2O abgespült und unter UV-Licht photographiert. Die Übertragung der DNS auf ein Nitrocellulose-Filter geschah nach der Methode von SOUTHERN (s.2.7.).

2.5. RNS - Markierung mit ^{32}P

Um die Filter-Hybridisierungen auch mit ^{32}P-markierter m RNS durchführen zu können, wurde m-RNS nach MAIZELS (1976) mit γ-^{32}P-ATP (> 2000Ci/mmol; Amersham Buchler) phosphoryliert. Als Enzym wurde die Polynucleotid-Kinase von Miles Lab. verwendet. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung mit SDS (0,2%) und E. coli-t RNS (1mg/ml) versetzt und das nicht eingebaute ^{32}P-ATP von der RNS über einer Sephadex-G-50-Säule (1,4x40cm) abgetrennt. Die RNS-Fraktionen wurden gepoolt, mit NaAc (0,2M) versetzt und mit 2,5 Vol. Alkohol bei -20°C ausgefällt. Die mit 80 000g (3-4 h) pelletierte m-RNS hatte eine spezifische Aktivität von $1x10^6$cpm/µg.

2.6. Nick Translation

Die für die Hybridisierung (2.9.) benötigte, hoch markierte DNS wurde durch Nick Translation erhalten.* Die Originalvorschrift von MANIATIS et al. (1975) wurde insofern geändert, als alle 4 Vorstufen markiert waren. (^3H-ATP, -TTP, - GTP, -CTP; Amersham Buchler).

Anstelle von 2 U DNS Polymerase I (grade I, Boehringer, Mannheim) wurden 12 U verwendet. Die Reinigung erfolgte über eine 1,5x40cm Sephadex G-50-Säule (1ml Fraktionen). Die pro Ansatz eingesetzte DNS Menge waren 1-2µg. Die erreichte spezifische Aktivität lag bei $4 \cdot 10^6$cpm/µg.

---

* Die gereinigte DNS wurde dankenswerterweise von Dr.G. Steinbrück, Inst. für Biologie III, Abtlg. Zellbiologie, Tübingen, zur Verfügung gestellt.

2.7. Southern - Transfer

Die auf dem Agarose-Gel aufgetrennte DNS wurde mit der von SOUTHERN (1975) beschriebenen Technik auf Nitrocellulose-Filter (Satorius; 0,15µm Porenweite) übertragen.

Die Denaturierung der DNS, der Transfer und die weitere Behandlung des Filters wurden nach ELSEVIER et al. (1978) durchgeführt. Die Filterstreifen wurden bis zur Hybridisierung bei Raumtemperatur gelagert.

2.8. In vitro - Translationsexperimente

Isolierte Poly A^+ - m RNS (2.2.1.3.) wurde im in vitro-System aus Reticulocyten translatiert.

Die Kaninchen wurden nach DARNBROUGH et al. (1973) mit Acetylphenylhacrazin anaemisch gemacht. Die Präparation der Reticulocyten geschah im wesentlichen nach HUNT et al. (1972). Das frische Lysat wurde sofort in ca. 200µl-Portionen in flüssigen Stickstoff getropft und so aufbewahrt. Unmittelbar vor Gebrauch wurde eine geeignete Lysatmenge aufgetaut und damit nach PELHAM und JACKSON (1976) die Translation durchgeführt. Der Nuclease--Verdau (Nuclease aus Staphylococcus aureus, Boehringer, Mannheim; 40µg/ml, 5-6 Min. bei 30°C) wurde für jedes Experiment immer erst vor der Translation durchgeführt, so daß die Proben nicht mehr eingefroren werden mußten. Jedem Translations-Mix wurde zusätzlich E. coli-t RNS zugefügt (20µg/ml); die eingesetzte m RNS Menge betrug 2-8µg; die Inkubation dauerte meistens 15 Min. (max. 25 Min.); markiert wurde mit ^{35}S-Methionin (20µCi/ml; Amersham Buchler).

Die Inkubation wurde durch Zugabe von 2 Vol. Proben-Puffer (2.4.3.3.) beendet und die Proteine (nach 2-3minütigem Aufkochen der Proben) auf einem PAA-Laemmli-Gel getrennt (2.4.3.3.). Die Registrierung der Radioaktivitätsverteilung erfolgte nach einer Fluorographie autoradiographisch (2.11.2. und 2.11.3.).

2.9. Hybridisierungsexperimente:

2.9.1. Hybridisierungsexperimente mit nick-translatierter DNS

Um den Prozentsatz der transkribierten DNS feststellen zu können, wurde denaturierte, nicktranslatierte DNS (500 Basen lang) mit Kern-RNS (im excess) hybridisiert; um den transkribierten DNS-Anteil zu bestimmen, dessen Sequenzen in Form von polysomaler RNS ins Plasma gelangen, hybridisierte man nick-translatierte DNS mit polysomaler Plasma-RNS (im excess).

Die nach 2.2.2.2. und 2.2.1.2. isolierte Kern- bzw. polysomale RNS (weitestgehend DNS-, salz- und RNase-frei) wurde in Phosphatpuffer (pH 7,0) gelöst, so daß dessen Konzentration nach Zugabe der nick-translatierten DNS (2.6.) 0,5M war. In den verschiedenen Versuchen betrug das DNS/RNS-Verhältnis 1:700. Die spezifische Aktivität der DNS betrug max. 4×10^6 cpm/µg. Je 5 - 20µl dieses RNS/DNS-Gemisches wurden nach GOLDBERG et al. (1978) in silikonisierte Glaskapillaren eingeschmolzen. Die eingesetzte Aktivität betrug pro Kapillare ca. 500 000 cpm, die RNS-Konzentration 2,5-6mg/ml (für niedere Rot-Bereiche wurden die Proben 1:5 verdünnt: 100 000 cpm, 0,5-3mgRNS/ml). Vor der Hybridisierung wurde die DNS in den Kapillaren bei 105°C (5 Min.) denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C solange, bis man auf Grund der Rot-Werte annehmen konnte, daß die Hybridisierung ein Plateau erreicht hatte und damit vollständig abgelaufen war. Für verschiedene Rot-Werte wurde nach entsprechender Inkubationszeit jeweils eine Kapillare entnommen, in Aceton/Trockeneis eingefroren und bei -20°C gelagert.

Zur Bestimmung des DNS/DNS- bzw. RNS/DNS-Doppelstrang-Anteils wurden die Kapillaren aufgetaut und der Inhalt in 0,5ml 0,12M Phosphatpuffer (pH 7,0) aufgenommen. 0,25ml (Probe A) wurden nach 2.4.1.3. über eine HAP-Säule gegeben und nach Abzug des DNS-Einzelstranganteils der Doppelstranganteil (RNS/DNS und DNS/DNS) bestimmt. Die restlichen 0,25ml (Probe B) wurden auf

0,05M Phosphatpuffer verdünnt, nach GALAU et al. (1974) mit RNase behandelt und nach Abtrennung der Einzelstrang-DNS (HAP-Säule) der verbleibende DNS/DNS-Doppelstrang-Anteil ermittelt. Nach Abzug des DNS/DNS-Doppelstrang-Anteils in Probe B vom Doppelstranganteil der Probe A ergab sich der RNS/DNS-Anteil für den jeweiligen Rot-Wert und damit - für Rot-Werte im Plateau-Bereich - der Anteil der Gesamt-DNS, der transkribiert wurde.

2.9.2. Filterhybridisierung mit jodierter RNS

Die zur Hybridisierung verwendete RNS wurde nach 2.2.1.2. (meistens 2.2.1.2.b) isoliert und nach 2.3. gereinigt. Die proteinfreie RNS wurde in H_2O (quarzdestilliert) gelöst (1mg/ml) und im wesentlichen nach PRENSKY (1976) jodiert*. Routinemäßig wurde die frisch jodierte RNS (nach der Sephadex-Säule) mit Proteinase K behandelt, mit Phenol/Chloroform (2x) und Chloroform (2x) extrahiert und mit E. coli-t-RNS gefällt.

Das Hybridisierungsverfahren basiert auf Arbeiten von GILLESPIE und SPIEGELMAN (1965) bzw. KOURILSKY et al. (1971) und wurde folgendermaßen durchgeführt:

Ein mit 1-10µg DNS-belegter Filterstreifen wurde gleichmäßig mit max. 400µl RNS-Lösung (ca. 10^6cpm in 5xSSC, 50% FA und 100µg t-RNS/ml) belegt, in dünne Frischhaltefolie (dicht) eingeschlagen, in eine weitere Plastikfolie zusammen mit einigen Tropfen Puffer eingeschweißt und bei 40°C 16-90 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Filter 1 h in 2x SSC gewaschen, dann in 1x SSC mit RNase(A u.T_1) behandelt (200µl/ml bzw. 25E/ml; 1 h bei 37°C) und unter 3maligem Wechsel nochmal in je 1l 2x SSC für je 1 h gewaschen. Nach dem Trocknen des Filters wurde die Radioaktivitätsverteilung autoradiographisch (2.11.3.) festgestellt.

* Die RNS-Jodierungen wurden von Dr.G. Steinbrück durchgeführt.

2.1o. Auftrennung der Gesamtproteine

Der Proteinauftrennung ging immer eine 15minütige Markierung der Zellen mit ^{35}S-Methionin (10-20µCi/ml bzw. eine Con A-Behandlung (2.1.3.) voraus. Jede Probe umfaßte 5ml konzentrierte (2.1.1.) Kulturen. Nach Beendigung der Markierung bzw. Con A-Behandlung wurden die Zellen zentrifugiert (500 rpm, Labofuge III, 30 sec), der Überstand abpipettiert, die pelletierten Zellen in 100µl Probenpuffer (2.4.3.3.) lysiert und mehrfach intensiv geschüttelt (Super-mix, Stufe 6). Anschließend wurden die Proben 2Min. lang im kochenden Wasserbad gehalten und nach Abkühlung jeweils so verdünnt, daß alle Proben einer Versuchsreihe dieselbe optische Dichte (280 bzw. 230nm) bzw. (ungefähr) dieselbe Radioaktivitätsmenge pro Volumen besaßen. Zur Auftrennung der Proteine wurden jeweils ca. 50 000 cpm/Gelbahn auf ein Laemmli-Gel (2.4.3.3.) aufgetragen.

2.11. Radioaktivitätsnachweis

2.11.1. Szintillationsmessung

- Alle Messungen für ^{3}H, ^{35}S und ^{32}P erfolgten in Plastik-Scintillationsgefäßen (20ml) mit dem Packard Liquid Scintillation Spectrometer, Tricarb.
  ^{125}J-Proben wurden im Packard Auto-Gamma Scintillation Spectrometer gemessen.
- Proben in kleinen wässrigen Volumina (5-50µl) wurden in 6-10ml Unisolv I (Zinsser, Frankfurt) gezählt, nachdem sie auf 5°C abgekühlt waren.
- 1mm-Gelscheibchen wurden in Scintillationsgefäßen entweder mit 250µl 0,1% SDS-Lösung oder mit 250µl 50mM Tris/HCl (pH 7,8), 10µg RNase/ml über Nacht (bei Zimmertemperatur oder bei 37°C unter Schütteln) eluiert. Nach Zugabe von 10ml Unisolv I und Kühlung der Proben (mehrere Stunden bei 5°C) erfolgte die Zählung.

- Für die Proben in 0,12M Phosphatpuffer wurde - nach einer Testreihe - Aqualuma (Seromed, München) als Scintillator verwendet. Voraussetzung für eine in allen Proben gleichbleibende Zählausbeute war gleiche Salzkonzentration und gleiches wässriges Volumen. Zu 3,33ml wässrigem Volumen wurden 12ml Aquasol pipettiert. Nach guter Mischung blieben die Proben meist über Nacht (bei 25°C) stehen und wurden dann gezählt.

2.11.2. Fluorographie

Die Polyacrylamidgele wurden nach BONNER und LASKEY (1974) behandelt und nach dem letzten Wässern bei 80-85°C auf einem Geltrockner (Schütt, Göttingen) getrocknet. Für die Autoradiographie wurde das mit dem getrockneten Gel belegte Filterpapier auf eine Glasplatte geklebt.

2.11.3. Autoradiographie

Die Radioaktivitätsverteilung auf Filterstreifen oder auf Flachgelen wurde autoradiographisch erfaßt:

Die getrockneten Filterstreifen wurden auf einer Glasplatte befestigt und mit einem Röntgenfilm (Kodak: X-Omat S), der mit einem abgeschwächten, diffusen Blitz sensibilisiert war (LASKEY and MILLS, 1975), belegt. Der Film wurde mit einem Kodak X-Omatic intensifying screen bedeckt und bei -70°C gelagert.

Nach Beendigung der Exponierung wurde der Film mit Kodak-Röntgenentwickler (LX 24) entwickelt und danach in Kodak-Fixierlösung (Al 4) fixiert.

Polyacrylamid-Gele wurden nach der Fluorographie (2.11.2.) genau so behandelt.

2.12. Analytische Methoden

a) Nucleinsäurenbestimmung

Die Konzentration gereinigter Nucleinsäuren wurde durch Extinktionsmessung bei 260nm in 10mm Quarzküvetten bestimmt. Für eine Extinktion von 1,0 wurde eine Nucleinsäurekonzentration von 50µg/ml angenommen. Proteinverunreinigungen wurden grob durch zusätzliche Extinktionsmessung bei 230 und 280nm abgeschätzt.

b) Diphenylamin-Methode (DPA)

DNS-Verunreinigungen in RNS-Präparationen wurden quantitativ mit der DPA-Methode (BURTON, 1956, verbessert von GILES und MYERS, 1965) bestimmt. Um den Materialverlust gering zu halten, wurde in reduziertem Volumen gearbeitet: 300µl hydrolysierte Probelösung wurden mit 300µl 4% DPA und 15µl Acetaldehyd (1,6mg/ml H_2O) vermischt und über Nacht bei 30°C inkubiert.

c) Molekulargewichtsbestimmung

Molekulargewichtsbestimmungen der RNS erfolgten elektrophoretisch im FA-PAA-Gel (s. 2.4.3.2.). Als Marker dienten unmarkierte ribosomale RNS von Stylonychia ($1{,}3 \cdot 10^6$D, $0{,}7 \cdot 10^6$D), E. coli-5-S-RNS und E. coli-t-RNS (Boehringer, Mannheim).

Die Bestimmung des mittleren Molekulargewichts erfolgte dadurch, daß zunächst die mittleren MG von Kurventeilen mit (relativ) homogenem Kurvenverlauf bestimmt wurden. Aus diesen wurde dann unter Berücksichtigung der relativen Kurvenflächen der Gesamtmittelwert berechnet.

3. Ergebnisse

3.1. Isolierung der RNS

Die Isolierung von RNS wird im allgemeinen durch RNase-Kontamination und der daraus resultierenden Degradation der RNS erheblich erschwert. Diese Schwierigkeit tritt auf, unabhängig davon, ob das Material für die Isolierung aus Zellkulturen (z.B. HeLa-Zellen; WIEGERS und HILZ, 1971), Gewebezellen höherer Organismen (Leberzellen; z.B. NIESSLING und SEKERIS, 1971) oder aus Protozoen (Tetrahymena; HILL, 1972) stammt, nur ihr Ausmaß ist gewebe- bzw. zellspezifisch. Insbesondere besitzen Zellkern und Nucleoli erhebliche RNase-Aktivitäten (PENMAN, 1969).

Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn man die Zellen direkt in phenolgesättigtem Puffer homogenisierte. Dabei dienten SDS und NaAS als Detergentien zur besseren Abtrennung der RNS von Proteinen. Eine relativ hohe Salzkonzentration bzw. hohe pH-Werte reduzieren mögliche RNase-Aktivitäten, ebenso wie das kurz vor dem Phenolisieren zugegebene EDTA, welches zusätzlich noch den Übergang von SDS in die organische Phase begünstigt und damit u.a. die Bildung schwerlöslicher Magnesiumsalze verhindert (PENMAN, 1969).

Die von SCHERRER und DARNELL (1962) beschriebene heiße Phenolextraktion wurde wegen der möglicherweise damit verbundenen Degradation (PETROVIC et al., 1965) nur im Reextraktionsschritt benutzt. Phenol wurde 1:1 mit Chloroform gemischt, um den spezifischen Verlust an PolyA^+-RNS (PERRY et al., 1972) zu verhindern und um eine schärfer begrenzte Interphase zu erhalten.

War die sofortige Zugabe von Phenol nicht möglich, wurden als RNase-Hemmer PVS bzw. Heparin verwendet (MURAMATSU, 1974; JOST und PEHLING 1976; BERRIDGE et al. 1976).

Das von SOLYMOSY (1968) als RNase Inhibitor eingeführte DEP* wurde nur zum Sterilisieren von Zentrifugenröhrchen gebraucht, aber nicht im Extraktionspuffer oder in anderen Lösungen verwendet, da es nach LEONARD et al. (1970) Adenin zerstört bzw. die biologische Aktivität der RNS vermindert (DENIĆ et al., 1970).

Da weder Heparin noch PVS und ebensowenig Bentonit (s. FEDORCSAK, 1969) ausreichende RNase-Hemmer sind, wurde zumindest vor der Phenolisierung bei 0°C gearbeitet und generell in hitzesterilisierten Gefäßen. Außerdem wurde - als beste Schutzmaßnahme vor RNase Aktivität - möglichst früh im Isolierungsvorgang ein Proteinase K-Verdau vorgenommen (WIEGERS und HILZ, 1971). Dieser war auch dann nötig, wenn die schon phenolextrahierte RNS unbeschadet über längere Zeit unter Alkohol gelagert werden sollte.

3.1.1. Gesamt-RNS aus ganzen Zellen

Da RNS mit dem geringsten Aufwand aus ganzen Zellen (2.2.) zu isolieren war, wurde solche "Gesamt-RNS" als Marker benutzt (Abb. 1). Wenn kein DNase-Verdau durchgeführt wurde, zeigt das Elektropherogramm im hochmolekularen Bereich einen relativ kleine DNS-Peak, dem die beiden ausgeprägten r RNS-Peaks folgen, welche nach PRESCOTT et al. (1973) S-Werte von 26 bzw. 17 und nach KASTENMEIER (1974) ein Molekulargewicht von $1,3 \times 10^6$D bzw. $0,7 \times 10^6$D besitzen. Im niedermolekularen Bereich ist ein deutlicher t-RNS-Peak zu sehen, an dessen schwerer Seite die 5S-RNS bei der vorliegenden Gel-Konzentration nur als Schulter sichtbar wird.

Die cpm-Verteilung zeigt zwei deutliche Maxima für die r RNS und eines im 5S- bzw. t RNS-Bereich. Weiterhin ist noch ein kleiner Peak bei $2,2 \times 10^6$D auffallend; ansonsten ist die Markierung relativ einheitlich. Die im Vergleich zur 26S-RNS höhere spezifische Markierung der 17S-RNS könnte auf eine geringere Halbwertszeit und die damit zusammenhängende

*Diäthylpyrrocarbonat

schnellere Bildungsrate dieser RNS hindeuten, wie es LEICK (1969) für Tetrahymena pyriformis nachgewiesen hat.

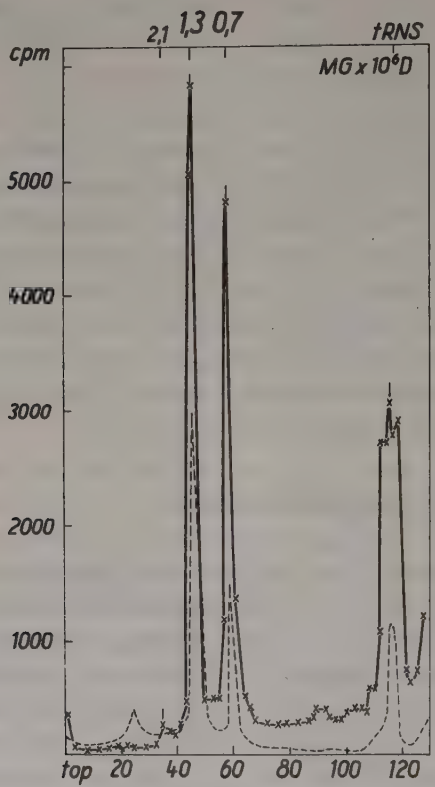


Abb. 1:
Elektropherogramm von Stylonychia mytilus-Gesamt-RNS. Nach der Markierung der Zellen mit ^{3}H-Uridin (10uCi/ml) wurde die RNS aus ganzen Zellen isoliert (2.2.) und auf einem 2,4%igen Polyacrylamid-Gel bei 5mA pro Gel (90-100V) aufgetrennt (2.4.3.1.). Die Elektrophoresedauer betrug 2,5 h. ----- : Absorption bei 265nm; x——x : cpm-Verteilung (vgl. 2.11.1.)

Hinsichtlich des MG der r RNS ist, wie die Tabelle I zeigt, Stylonychia, wie andere Ciliaten auch, mit Pflanzen zu vergleichen:

Tabelle I (verändert nach LOENING, 1968):

Organismus:	MG der r-RNS ($x10^6$D):	
HeLa	$1,7_5$	$0,7_0$
Maus	$1,7_1$	$0,7_0$
Xenopus (Leber)	$1,5_1$	$0,7_0$
Drosophila	$1,4_0$	$0,7_3$
Höhere Pflanzen (Erbse, Bohne, Mais)	1,3	0,7
Tetrahymena	$1,3_0$	$0,6_9$
Paramecium	$1,3_1$	$0,6_9$
Stylonychia	1,3	0,7
Euplotes*	1,2	$0,7_2$
Sacharomyces	$1,3_0$	$0,7_2$
E. coli	$1,0_7$	$0,5_6$
Rhodopseudomonas	$1,0_8$	$0,5_9$

* LIPPS, 1974

3.1.2. Plasma-RNS

Die Plasma-RNS enthält überwiegend r RNS. Wenn man aber vor der Markierung die r RNS-Synthese mit Actinomycin D (2.1.2.) hemmt, zeigt das Elektropherogramm der isolierten RNS eine Radioaktivitätsverteilung, die allein auf m RNS, 5S- und t-RNS zurückgeht (Abb. 2) und im wesentlichen einen Größenbereich von 2,6 x 10^4D bis ca. 1,3x10^6D umfaßt. Dabei fällt auf, daß die Gesamt-m RNS in Fraktionen aufgeteilt ist, deren Haupt-Peaks bei 0,75x10^6D bzw. bei 0,44x10^6D liegen. Da nach PERRY und KELLEY (1968) die 5S-RNS bei niederen Actinomycin D-Konzentrationen nicht gehemmt wird, geht der Peak im niedermolekularen Bereich wohl auf 5S bzw. t RNS zurück. Das nach 2.12.c ermittelte mittlere MG beträgt ca. 0,4x10^6D,

wenn man die 5S- und t RNS mit berücksichtigt; ohne 5S- und t RNS liegt es etwas höher: bei 0,4–0,5x10^6D.

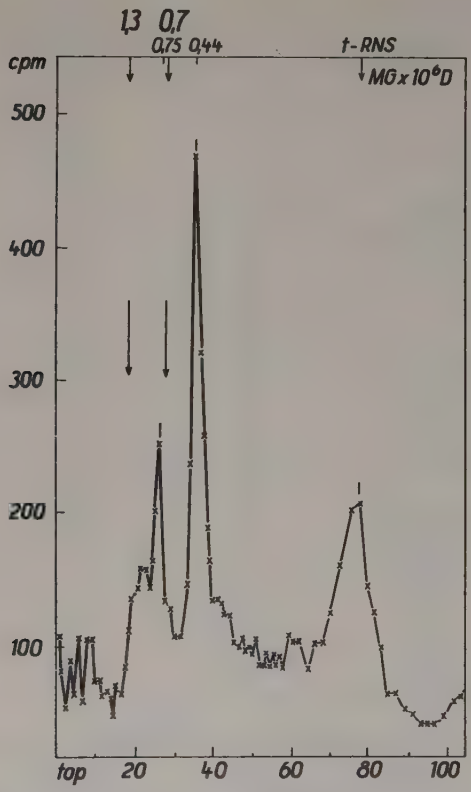


Abb. 2:
Elektrophoretische Auftrennung der Gesamt-Plasma-RNS von Stylonychia mytilus-Zellen, die mit Actinomycin D behandelt waren (1ug/ml über 20 h; vergl. 2.1.2). Aus den mit ^{3}H-Uridin (10mCi/ml) markierten Zellen (2.2.) wurde die RNS nach 2.2.1.1. isoliert. Die Auftrennung erfolgte auf einem 3,4%-igen Polyacrylamid-Gel in 99% Formamid über 15 h bei 5^{0}C (vergl. 2.4.3.2.). Infolge der Actinomycin D-Behandlung sind die dargestellten cpm allein auf die m RNS, 5S- und t RNS von Stylonychia zurückzuführen. Als Molekulargewichtsstandard diente unmarkierte r RNS von Stylonychia und E. coli t RNS (Pfeile).

3.1.3. Poly A^+-Plasma-RNS

Das Vorhandensein eines Polyadenylsäurestückes am 3'-Ende von m-RNS-Molekülen ermöglicht es, sie säulenchromatographisch anzureichern. Als Säulenmaterial für die selektive Bindung des Poly A-Stückes verwendet man Oligo dT-Cellulose (Collaborative Research, Mass.) oder Poly U-Sepharose (Pharamcia, Schweden). Da Cellulose offensichtlich eine höhere unspezifische Bindung für Nucleinsäuren besitzt (Pharmacia, 1974) wurde in den meisten Versuchen Poly U-Sepharose verwendet. Die nach 2.2.1.3. isolierte, Poly A-tragende m-RNS-Fraktion umfaßt 0,9-1,4% der Gesamt-Plasma-RNS. (Aus Experimenten, in denen jeweils die absorbierten cpm bzw. die absorbierte OD registriert wurden.) Das aus dem inhomogen verlaufenden Elektropherogramm ermittelte mittlere MG (nach 2.12.c) liegt bei $0{,}6 \times 10^6$D. (Abb. 3).

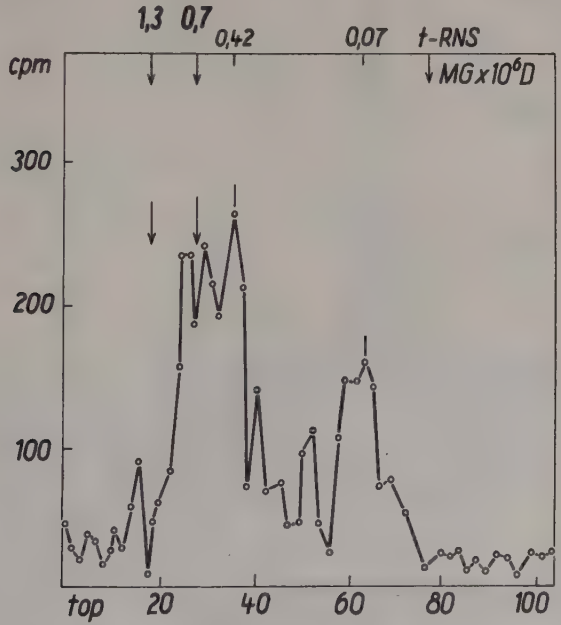


Abb. 3: Elektropherogramm der Poly A^+-RNS. Die Zellen wurden wie in Abb. 2 mit Actinomycin D behandelt und mit ^{3}H-Uridin markiert. Anschließend wurde die Gesamt-Plasma-RNS nach 2.2.1.1. isoliert u.die Poly A^+-RNS von der restl.RNS über Poly U-Sepharose-Säulen abgetrennt (2.2.1.3.). Die Elektrophorese wurde wie in Abb.2 durchgeführt.

Beim Vergleich der Poly A^+ = m RNS mit der Gesamt-m RNS in Abb. 4 ist zu berücksichtigen, daß die beiden Kurven aus nacheinander durchgeführten Experimenten stammen, und daß in verschiedenen Experimenten zwar das relative Peak-Muster erhalten bleibt, die absoluten Peak-Höhen aber schwanken können. Dennoch wird deutlich, daß die Markierung der Poly-A^+-Plasma-RNS in den Bereichen um $1{,}0 \times 10^6$D, $0{,}6 \times 10^6$D und $0{,}07 \times 10^6$D relativ stärker und zwischen $0{,}1$-$0{,}2 \times 10^6$D bzw. im 5S- und t RNS-Bereich relativ geringer ist.

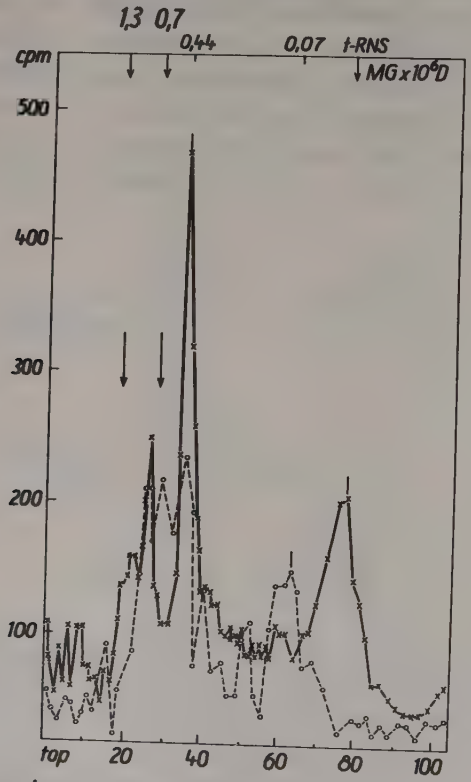


Abb. 4: zeigt einen Vergleich von Gesamt-Plasma-RNS (ohne ribosomale RNS) mit der Poly A^+-RNS aus Stylonychia-Zellen. In beiden Fällen waren die Zellen wie in Abb. 2 mit Actinomycin D behandelt und mit ^{3}H-Uridin markiert. Die Elektrophoresebedingungen und die Molekulargewichtsmarker (Pfeile) entsprechen denen in Abb. 2 x———x : Gesamt-Plasma-RNS nach Actinomycin D-Behandlung (=m RNS); o-----o : Poly A^+-RNS.

Auch der Vergleich von Poly A^+-m RNS aus unbehandelten Zellen mit solcher aus Zellen mit ConA-Behandlung zeigt Unterschiede im Elektropherogramm beider RNS-Präparationen. Die RNS aus "ConA-Zellen" zeigt im Bereich um $1,3x10^6$D bzw. zwischen $0,1-0,2x10^6$D eine relativ starke Markierung, während sie im Bereich um $0,44x10^6$D geringer ist. (Abb. 5)

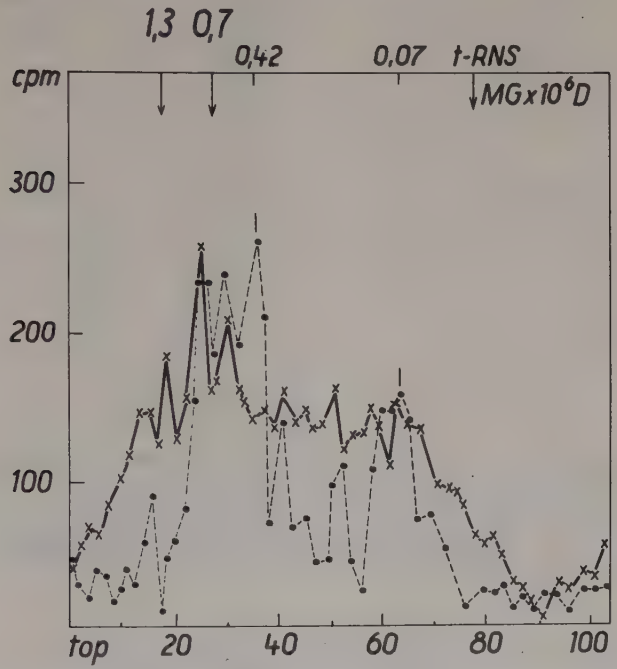


Abb. 5: ist ein Vergleich der Poly A^+-RNS aus normalen Stylonychia-Zellen mit der Poly A^+-RNS aus Zellen nach einer Concanavalin A-Behandlung (2.1.3.) dargestellt. x——x : Poly A^+-RNS aus "ConA-Zellen"; •------•: Poly A^+-RNS aus "n-Zellen". Die Actinomycin D-Behandlung der Zellen und ihre Markierung mit ^{3}H-Uridin wurde wie bei Abb. 2 bzw. entspr. 2.1.2. und 2.2. durchgeführt. Die Elektrophoresebedingungen entsprechen denen von Abb. 2.

Das in Abb. 6 dargestellte Elektropherogramm der nach 2.2. 1.3. isolierten Poly-A-Stücke zeigt einen Hauptpeak, der einen Bereich von 30 000D-48 000D (= 90-145 Nucleotide) umfaßt und ein Maximum bei ca. 39 000D (= 120 Nucleotide) hat.

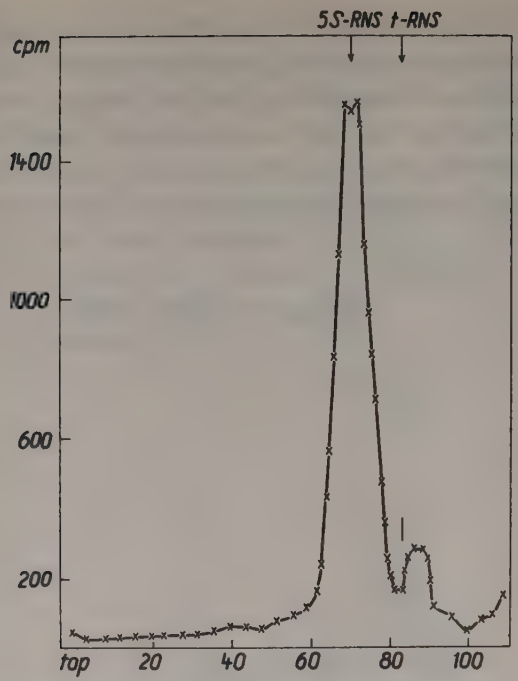
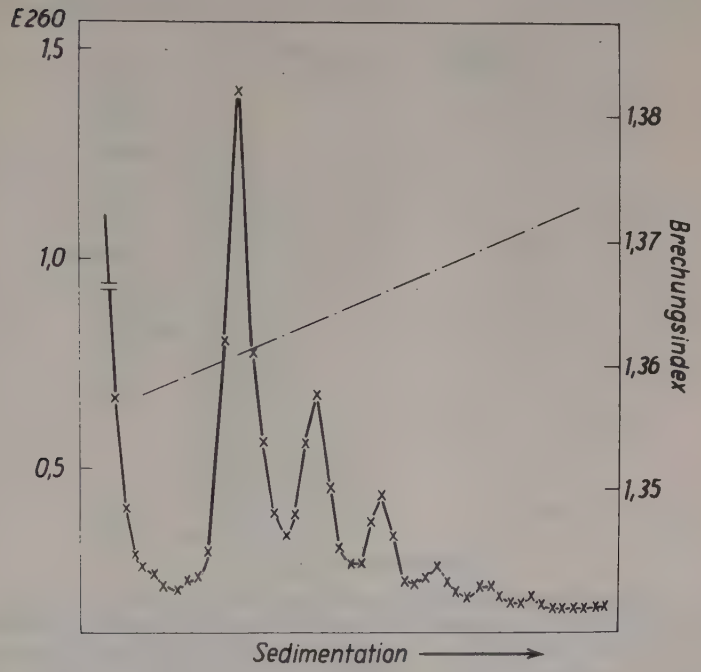


Abb. 6:
Das Elektropherogramm zeigt die Poly A-Sequenz der Poly A^+-RNS von Stylonychia mytilus. Die Zellen waren mit ^{3}H.Adenosin (10µCi/ml) markiert (2.2.). Die Poly A-Sequenz wurde nach 2.2.1.3. isoliert und zusammen mit unmarkierter E. coli 5S- und t RNS auf einem 10%igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt; Elektrophoresedauer: ca. 3 h (vergl. 2.4.3.1.).

3.1.4. Polysomen und polysomale Untereinheiten

Zum Teil wurde die m RNS aus der Polysomen-Fraktion isoliert (2.2.1.2.). Es lag deshalb nahe, festzustellen, wie das Polysomenmuster bei Stylonychia aussieht (Abb. 7). Im Gegensatz zu Polysomen aus Mäuse- oder Rattenleber bzw. aus Embryo- oder Hirnzellen (vgl. MORTON, 1975) nimmt die Häufigkeit bei Stylonychia-Polysomen vom Monomeren- zum Hexameren-Peak hin ab. Das Muster ist eher mit dem aus Ratten-Thymus-Zellen (MORTON, 1975) bzw. mit dem von membrangebundenen Polysomen aus Hundepankreas (SCHEELE et al., 1974) oder E. coli (VARENNE, 1978) zu vergleichen. Dabei ist zu bemerken, daß

sich die Stylonychia-Zellen in der Log-Phase befanden und daß die Isolierung in Gegenwart von Cycloheximid (SCHLAEGER, 1969) durchgeführt wurde.



In Abb. 7 ist die Auftrennung der Polysomen von Stylonychia in einem linearen Zuckergradienten (15-30%; 36ml) dargestellt. Die Präparation der Polysomen erfolgte nach 2.2.1.2.a. Der Gradient wurde 2,5 h bei 27 000 rpm im SW 27-Rotor (Beckman Ultrazentrifuge L5·65) zentrifugiert und anschließend in 0,7ml Portionen fraktioniert.

Daß die Polysomen nach der Dialyse gegen 0,7mM K^+EDTA (2.2.1.2.b) tatsächlich in ribosomale Untereinheiten zerfallen, zeigt Abb. 8. Die ribosomalen Untereinheiten banden im Saccharose-Gradienten zwischen dem Plasma-RNS- und dem Ribosomen-Peak.

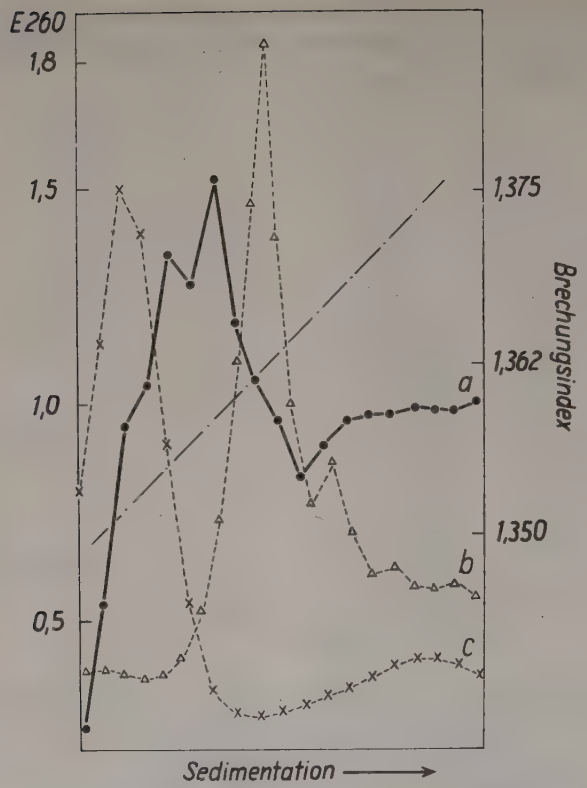


Abb. 8: zeigt, daß die Polysomen nach der Dialyse gegen 0,7mM K⁺EDTA (2.2.1.2.b) offensichtlich in ihre Untereinheiten zerfallen sind, denn das Dialysat bandet im linearen Zuckergradienten (15-30%, 12ml; SW 41, Beckman L5·65; 39 000 rpm, 2 h, 1°C) zwischen cytoplasmatischer RNS und dem Monosomenpeak einer Polysomenpräparation. Die Ribosomen-Untereinheiten (•———•), die Polysomen (△-----△) und die RNS (x-----x) wurden gleichzeitig, aber in verschiedenen Röhrchen, zentrifugiert; nach der Fraktionierung wurden die ermittelten OD-Werte (260nm) im selben Diagramm aufgetragen.

3.1.5. RNS aus Polysomen

3.1.5.1. m RNS

Wenn man m RNS nach 2.2.1.2. aus Polysomen isoliert, ist diese zwar deutlich angereichert, aber immer noch stark mit r RNS kontaminiert, was Abb. 9 zeigt.

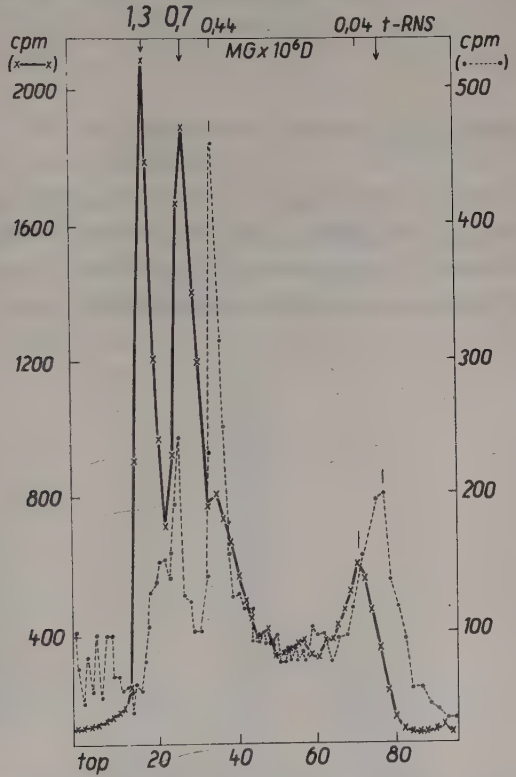
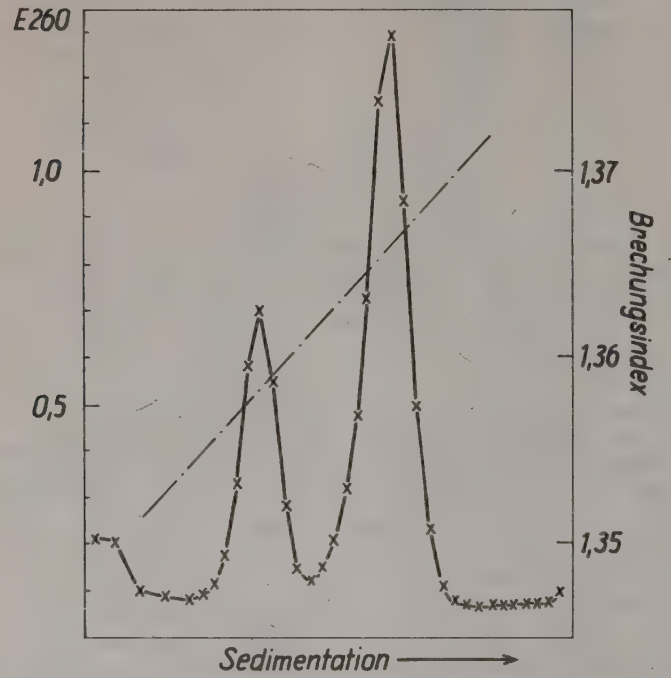


Abb. 9: zeigt die elektrophoretische Auftrennung der nach 2.2.1.2. aus Polysomen angereicherten m RNS von Stylonychia (x——x). Die Zellen wurden vor der ^{3}H-Uridin-Markierung nicht mit Actinomycin D behandelt. Der r RNS-Anteil ist deutlich zu sehen. Die Verbreiterung des kleinen ribosomalen Peaks ($0,7 \times 10^{6}$D) und dessen Schulter bei $0,44 \times 10^{6}$D lassen allerdings eine Anreicherung von m RNS vermuten, zumal genau in diesem Bereich die ebenfalls markierte Gesamt-Plasma-RNS bandet (·------·), welche nach einer Actinomycin D-Behandlung der Zellen isoliert wurde und deshalb der m RNS von Stylonychia entspricht (vgl. Abb.2). Die Elektrophoresebedingungen und Molekulargewichtsstandards (Pfeile) sind die gleichen wie in Abb. 2.

Die RNS aus der Polysomen-Fraktion ist im Gegensatz zur Plasma-RNS nicht mit Actinomycin D gehemmt. Obwohl beide Kurven aus verschiedenen Experimenten stammen, zeigt der Vergleich deutlich, daß die Verbreiterung des kleinen ribosomalen Peaks der Polysomen-RNS offensichtlich darauf zurückzuführen ist, daß sich in seinem Bereich gleichzeitig der $0{,}7 \times 10^6$D- und der $0{,}44 \times 10^6$D-Peak der Plasma (=m RNS) RNS befinden; letzterer tritt als Schulter auf der leichten Seite dieses Peaks auf.

3.1.5.2. Ribosomale RNS (vergl. 2.2.1.4.)

Die ribosomale RNS der polysomalen Fraktion wurde zum Testen der Hybridisierungsbedingungen oder zur Untersuchung der Chromatinstruktur im Makronucleus (z.B. LIPPS et al., 1978) verwendet. Der Saccharose-Gradient (Abb. 10) diente dabei



In Abb. 10 ist die Auftrennung der r RNS im linearen Sucrose-Gradienten (12-30%) dargestellt. Die Präparation und die Zentrifugationsbedingungen sind unter 2.2.1.4. beschrieben.

als zusätzlicher Reinigungsschritt vor der Jodierung und zur Auftrennung der beiden r RNS Spezies, welche nötig wird, wenn man z.B. die r DNS näher charakterisieren möchte; des weiteren kann er zu Anreicherung von 5S-RNS benutzt werden. Aus der Abbildung wird im übrigen das 2:1 Mengenverhältnis der beiden r RNS-Species deutlich. Die MG wurden gelelektrophoretisch bestimmt (vgl. 3.1.1.).

3.1.6. Kern-RNS (vergl. 2.2.2.)

Da eine mit DNS verunreinigte Kern-RNS die Ergebnisse der RNS-Excesshybridisierungen (2.9.1.) verfälschen würde, mußte eine DNS Kontamination dieser RNS vermieden bzw. möglichst gering gehalten werden. Die Kern-RNS wurde deshalb in einem CsCl-Gradienten von der Hauptmasse der DNS getrennt (2.4.2.2.; Abb. 11), d.h. die DNS-Kontamination der RNS betrug nach dem Gradienten noch ca. 0,7% (Bestimmung nach der DPA-Methode: 2.12.).

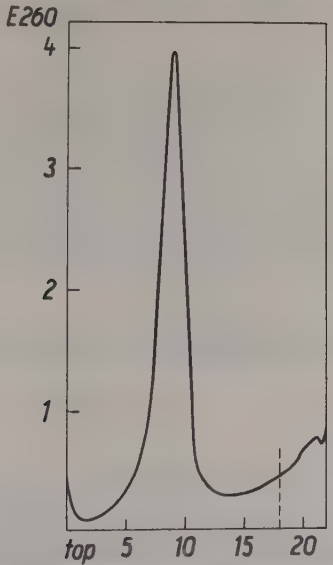
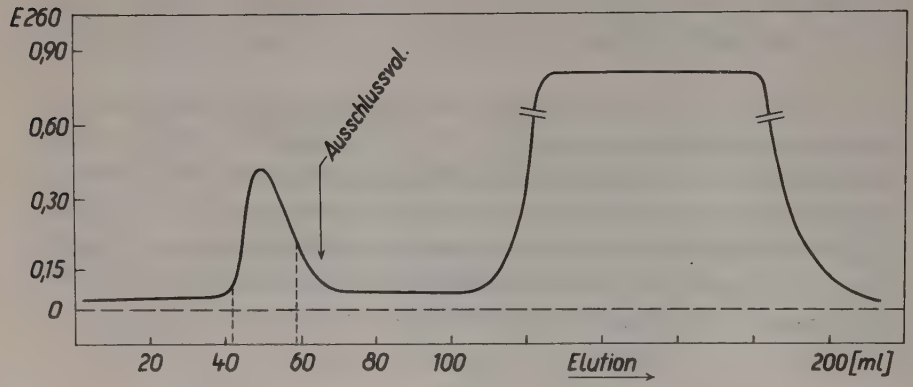


Abb. 11: zeigt die Trennung von Makronucleus-DNS u.-RNS im CsCl-Gradienten. Die Hauptmasse der DNS ist deutlich als Bande zu sehen, während die RNS hauptsächlich in den Bodenfraktionen bzw. im Pellet zu finden ist. Die Kern-RNS wurde aus den Fraktionen 18-22 bzw. aus dem pelletierten Material nach 2.2.2.2. isoliert und weitergereinigt. Die Durchführung der CsCl-Zentrifugation ist unter 2.4.2.2. beschrieben.

Da nach der anschließenden DNase-Behandlung (2.2.) - wie Kontrollexperimente zeigten - ca. 96% der DNS soweit abgebaut waren, daß die Bruchstücke nicht mehr im Ausschlußvolumen der Sephadex-G-50-Säule (2.4.1.1.) eluiert wurden (Abb. 12) betrug die Restkontamination der Kern-RNS mit DNS höchstens noch ca. 0,03%.



In Abb. 12 ist das Elutionsprofil einer Sephadex-G-50-Säule (1,6cm Querschnitt, 170ml Säulenvolumen) zu sehen. Aufgetragen wurde die im CsCl-Gradienten angereicherte und anschliessend mit DNase behandelte Kern-RNS (2.2.). Das RNS-Material ist im symmetrischen Ausschlußpeak enthalten. Das Ausschlußvolumen der Säule ist mit dem Pfeil gekennzeichnet. Der große zweite Peak beinhaltet im wesentlichen Phenol/Chloroform-Reste der Präparation und außerdem niedermolekulare DNS-Stücke bzw. Nucleotide (vergl. hierzu: 2.4.1.1.).

3.2. Molekulargewichtsvergleich von Kern- und Plasma-RNS

Kern-RNS:

Die nach 2.2.2.1. auf einem FA-PAA-Gel (2.4.3.2.) aufgetrennte Kern-RNS zeigt den in Abb. 13 wiedergegebenen Kurvenverlauf. Der Hauptpeak liegt bei $2{,}1 \times 10^6$ D.

Werden die Zellen vor der Markierung mit 1µg/ml Actinomycin D (2.1.2.) behandelt, so zeigt das entsprechende Elektropherogramm ein sehr ähnliches Peakmuster, jedoch ohne diesen

Hauptpeak (Abb. 14 und 15), was den Schluß zuläßt, daß es sich um eine Vorstufe der r RNS handelt.

Zur MG-Bestimmung und zum Vergleich mit der Plasma-RNS diente Kern-RNS aus Zellen, die mit Actinomycin D vorbehandelt waren. Die Kern-RNS umfaßt unter den dargestellten Bedingungen den Bereich von ca. $0,3 \times 10^6$D-$3,8 \times 10^6$D (jeweils Peak-Basis), das nach 2.12.c ermittelte mittlere MG liegt bei $1,5 \times 10^6$D (Abb. 15).

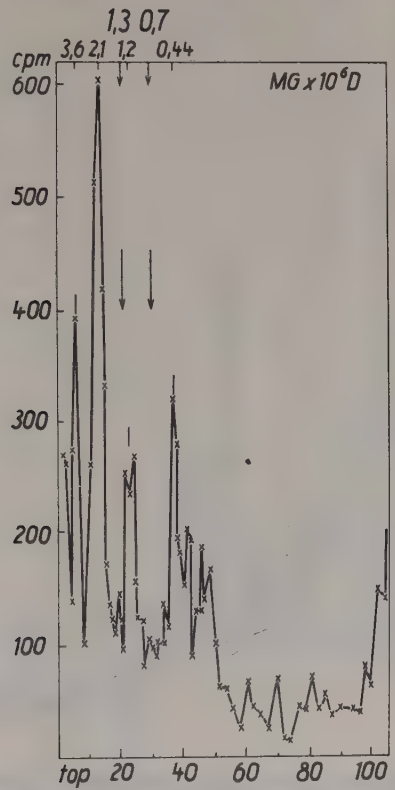


Abb. 13: Das Elektropherogramm in Abb. 13 zeigt die Makronucleus-RNS von Stylonychia. Die Zellen wurden mit ^{3}H-Uridin (10µCi/ml) markiert (2.2.). Die Extraktion der RNS erfolgte nach 2.2.2.1. und die Elektrophorese wurde mit einem 3,4%igen Polyacrylamid-Gel (in 99% Formamid) nach 2.4.3.2. durchgeführt. Als Molekulargewichtsmarker diente unmarkierte r RNS von Stylonychia (Pfeile).

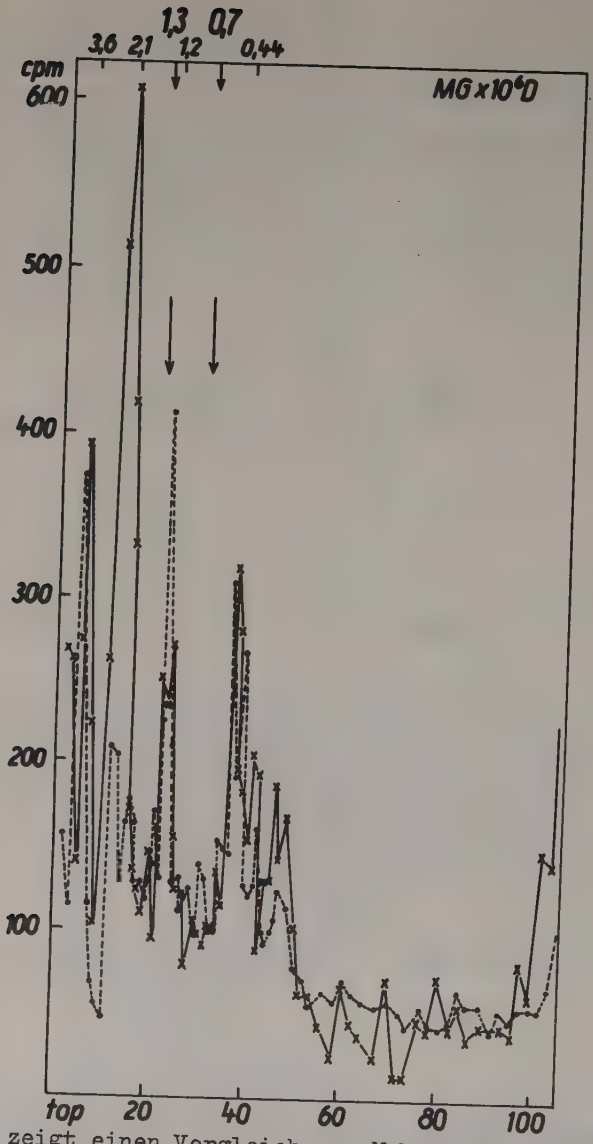


Abb. 14: zeigt einen Vergleich von Makronucleus-RNS aus normalen Zellen (x———x) mit solcher, die aus Zellen isoliert wurde, welche mit Actinomycin D (1µg/ml über 20 h) behandelt waren (•------•); vergl. 2.1.2./ Daß der große Peak bei 2,1x10⁶D den r RNS-Precursor repräsentiert, wird dadurch bestätigt, daß er nach der Actinomycin D-Behandlung verschwindet. Die Markierungs- und Elektrophoresebedingungen waren diesselben wie bei Abb. 13.

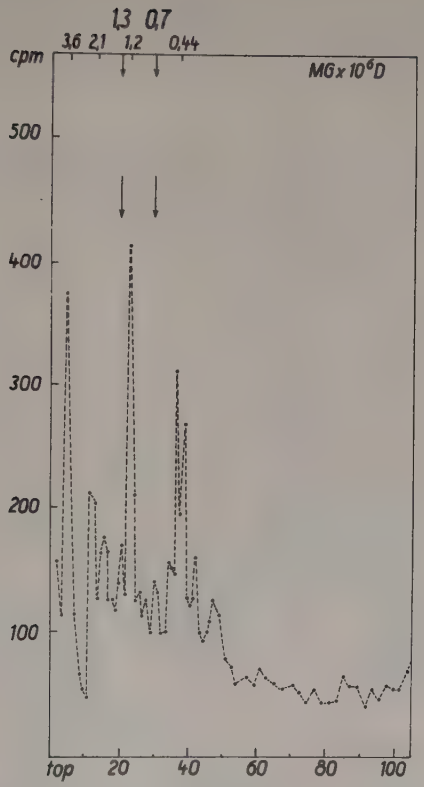


Abb. 15:
Elektrophoretische Auftrennung von Makronucleus-RNS aus Zellen nach einer Actinomycin D-Behandlung (vergl. Abb. 14).

Vergleich:

Der Vergleich mit Plasma-RNS (3.1.2. nach Actimomycin-D-Hemmung) zeigt zwar eine Überlappung der MG im Bereich 0,3-1,3x10^6D, jedoch fehlen der Plasma-RNS die höhermolekularen Sequenzen, während die Kern-RNS im niedermolekularen Bereich kaum vertreten ist (Abb. 16).

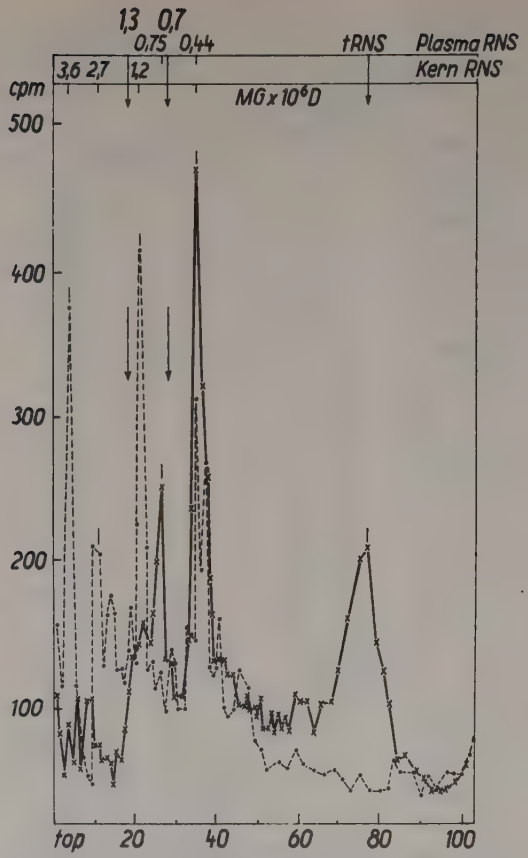


Abb. 16:
Vergleich von Makronucleus-RNS aus Zellen, die mit Actinomycin D behandelt waren, mit der Gesamt-Plasma-RNS, die ebenfalls aus Actinomycin D-behandelten Zellen isoliert wurde. Die Markierungs- und Elektrophoresebedingungen entsprechen denen von Abb.13. Es wird deutlich, daß der Plasma-RNS bzw. m RNS (vgl. 3.1.2.) die hochmolekularen Sequenzen der Kern-RNS fehlen.-----: Ma-RNS; x———x: Gesamt-Plasma-RNS.

3.3. Sättigungshybridisierung im RNS-Excess

Während der Hybridisierung betrug der polysomale- (2.2.1.2.) bzw. Kern-RNS-(2.2.2.2.)Überschuß im Vergleich zur eingesetzten (nicktranslatierten) DNS (2.9.1.) in den Kapillaren ca. 700:1. Die Reaktion verlief also nur in Abhängigkeit von der RNS-Konzentration, deshalb wurde nach BRITTEN et al. (1974)

der "Rot"-Wert (anstelle des "Cot"-Wertes; Rot = $\frac{A260xh}{2}$ berechnet. Da die effektive Salzkonzentration während der Reaktion 0,5M (statt 0,12M) PB betrug, muß der "Rot"-Wert mit dem Faktor 5,8 zum "E rot" = 1/2x5,8xA260xh korrigiert werden.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte nach BRITTEN und KOHNE (1968) auf halblogarithmischem Papier (Abb. 17 - 19).

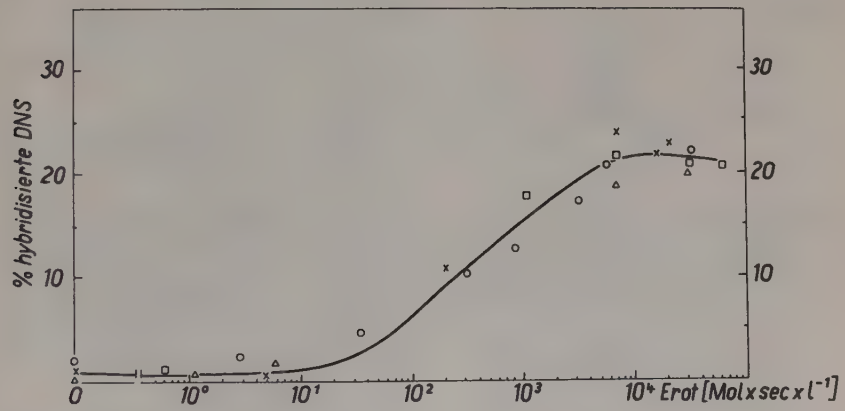


Abb. 17 (Text s. Abb. 19)

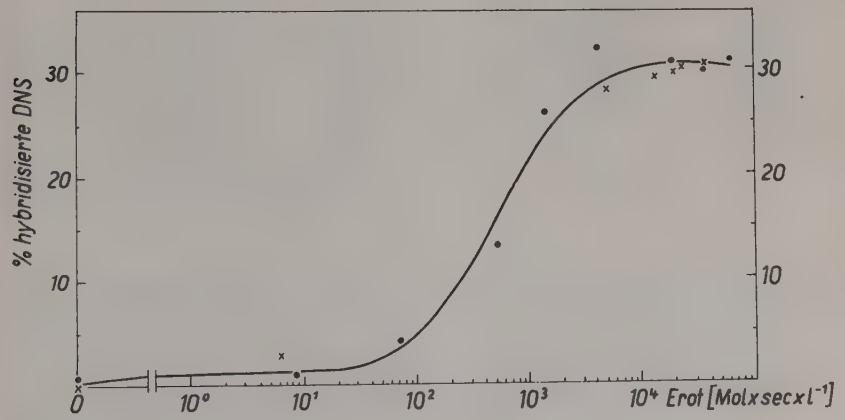


Abb. 18 (Text s. Abb. 19)

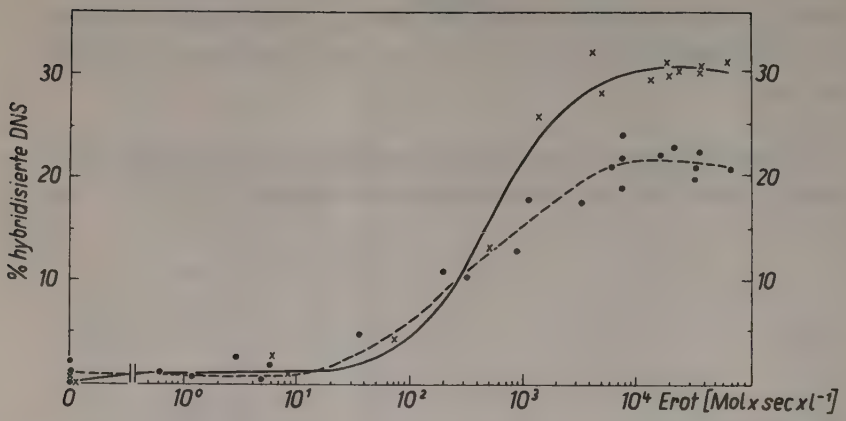


Abb. 17 - 19:
Verlauf der Hybridisierung von polysomaler RNS (im Excess) mit Makronucleus-DNS (Abb. 17) und von Makronucleus-RNS(im Excess) mit Makronucleus-DNS (Abb. 18). Abb. 19 zeigt einen Vergleich beider Hybridisierungsabläufe. Die unterschiedlichen Symbole in den Abb. 17 und 18 geben die Werte der Einzelexperimente wieder (vergl. Tab. II). Die Hybridisierungen wurden in Glaskapillaren und in 0,5M Phosphatpuffer (pH 7,0) bei 65°C durchgeführt (vergl. 2.9.1.).

Die Erot-Werte und die ihnen entsprechenden RNS/DNS-Doppelstranganteile (in %) sind für die einzelnen Experimente in Tabelle II zusammengefaßt:

Tabelle II

Polysomale RNS:

Exp.	Erot	% Hybrid.
1 "o"	0	2
	3	2,2
	36	4,5
	330	10,2
	900	12,6
	3310	17,3
	6190	20,8
	36800	22,1
2 "Δ"	0	0
	1,2	0,5
	6	1,6
	7620	18,5
	33700	19,7

Exp.	Erot	% Hybrid.
3 "X"	0	0,7
	5	0,2
	200	10,7
	7490	23,8
	16900	21,7
	22100	22,6
4 "□"	0,6	0,6
	1120	17,6
	7510	21,3
	33100	20,7
	68000	20,4

Kern-RNS:

Exp.	Erot	% Hybrid.
1 "•"	0	0
	8,5	1,5
	71,8	4,0
	513	12,0
	1372	25,6
	4110	31,8
	18700	30,6
	37700	29,7
	62400	30,7

Exp.	Erot	% Hybrid.
2 "X"	0	0
	6,2	2,5
	4900	27,7
	13400	28,8
	19700	29,4
	22900	30,0
	37000	30,2

Die Diagramme (Abb. 17 - 19) zeigen für die polysomale RNS bei 20% und für die Kern-RNS bei 30% DNS-Hybridisierung ein Plateau. Mit der angewandten Methode findet man also, daß der polysomalen RNS 20% und der Kern-RNS 30% der Einzelstrang-DNS-Sequenzen entsprechen. Legt man die bei Eukaryonten

übliche asymmetrische Transkription zugrunde, so verdoppelt sich der jeweils betroffene DNS-Anteil auf 40 bzw. 60%.

3.4. Unterschiede im Proteinmuster von unbehandelten- und Con A-Zellen

Die Behandlung von Stylonychia Kulturen mit dem Pflanzenlectin Concanavalin A (ConA) führt zu bedeutenden Änderungen in der Zelle:

Die Cirren verkleben, und nach Abwurf der alten Pellicula wird eine neue gebildet (FRISCH et al., 1976). Die Micronuclei beginnen sich zu teilen (BESSLER und LIPPS, 1976) und ca. 1 h nach der Con A-Behandlung ist auch ein Anstieg in der RNS-Synthese zu beobachten (LIPPS und BESSLER, 1977). Die Vermutung, daß dabei RNS nicht nur vermehrt synthetisiert, sondern auch "Con A"-spezifische RNS gebildet wird, konnte bestätigt werden (LIPPS et al., 1978). Konsequenterweise sollte auch in der nachfolgenden Proteinsynthese eine qualitative Änderung zu beobachten sein. Im positiven Fall wären weitere Untersuchungen auf dem RNS/DNS-Niveau unter dem Aspekt der Genregulation gerechtfertigt.

Um eine vermutete Änderung im Proteinmuster feststellen zu können, wurden zu verschiedenen Zeiten nach Con A-Behandlungsbeginn die markierten Gesamt-Proteine der Zellen auf einem Laemmli-Gel aufgetrennt (2.10.) und autoradiographisch analysiert (2.11.2.; 2.11.3.). Ein Vergleich mit dem Proteinmuster aus n-Zellen zeigt die Abb. 20. Die Proteine in a, b und c wurden nach unterschiedlich langer Con A-Behandlung aufgetrennt; in b und c sind deutliche Unterschiede zu a und der Kontrolle (K) zu erkennen.

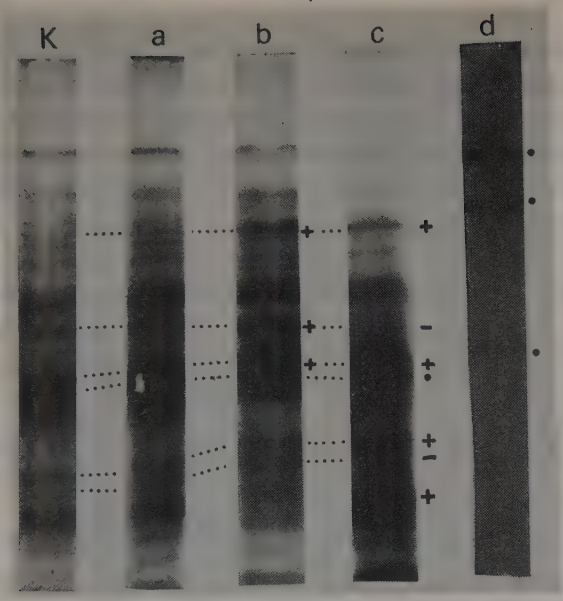


Abb. 20: zeigt die Veränderungen im Proteinmuster von Stylonychia-Zellen, die als Folge der Concanavalin A-Behandlung auftreten. Die Zellen wurden für 15 Min., jeweils vor Beendigung der unterschiedlich langen Con A-Behandlung (2.1.3.), mit ^{35}S-Methionin (10-20µCi/ml) markiert. Die anschließende Auftrennung der Gesamtproteine erfolgte auf Laemmli-Gelen (vergl. 2.10. und 2.4.3.3.).

K zeigt als Kontrolle die Proteine aus unbehandelten Zellen
a zeigt das Proteinmuster nach 1 h Con A-Behandlung
b zeigt das Proteinmuster nach 3 h Con A-Behandlung
c zeigt das Proteinmuster nach 5 h Con A-Behandlung
"+": Bande nimmt innerhalb der 5 h zu
"-": Bande nimmt innerhalb der 5 h ab
"•": starke, in ihrer Intensität gleichbleibende Bande
In d sind 3 Molekulargewichtsstandards dargestellt:
67 000D, 45000D und 25000D.

3.5. Translation von "Con A-RNS" im Retikulocyten-System (RCS)

Eine direktere Methode, Con A-spezifische m RNS-Sequenzen nachzuweisen, ist die in-vitro-Translation. Sie wurde im RCS durchgeführt, und zwar mit polysomaler Poly A^+-RNS, da diese RNS-Fraktion schon im Elektropherogramm Unterschiede zeigt, je nachdem, ob sie aus Normalzellen oder aus Zellen isoliert wurde, die 60 Min. mit Con A behandelt waren (Abb. 5).

Nach Beendigung der Translation wurden die Proteine des RCS auf einem Laemmli-Gel aufgetrennt (2.8.). Im Autoradiogramm werden anschließend nur die neusynthetisierten Proteine als Banden dargestellt. Unterschiede, die im Bandenmuster auftreten, sind auf Unterschiede der als Matrize fungierenden m RNS zurückzuführen.

Abb. 21 zeigt die Auftrennung von Proteinen, die im RCS nach Vorgabe unterschiedlicher m RNS synthetisiert wurden:

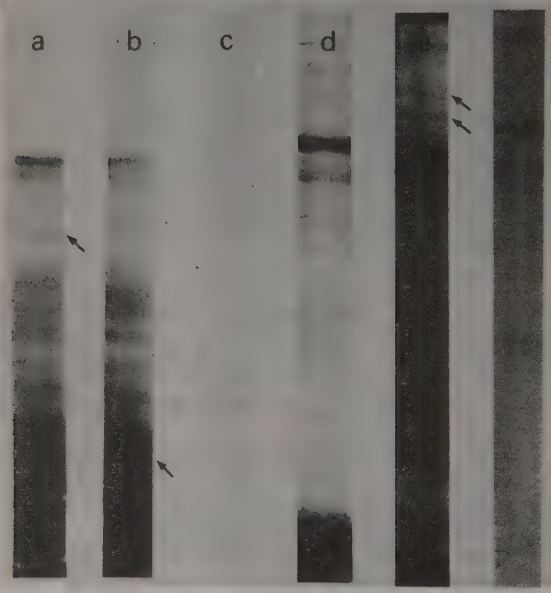


Abb. 21: zeigt die Autoradiographie der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine, welche im in-vitro-Translationssystem (Reticulocytensystem) synthetisiert wurden. Nachdem die endogene RNS des in-vitro-Systems mit Nuclease verdaut war (c), wurde dem System in den Experimenten a, b und e Stylonychia-RNS zugegeben. Die Banden dieser Gelstreifen repräsentieren deshalb Stylonychia-spezifische Proteine. Weitere Einzelheiten sind im Text beschrieben.

d zeigt die RCS-spezifischen Proteinbanden (die endogene RNS ist aktiv); c zeigt die Kontrolle nach dem Nucleaseverdau der endogenen RNS: es sind keine Banden sichtbar; b zeigt Proteinbanden nach Zugabe von Poly A^+-RNS aus n-Zellen und a das Bandenmuster nach Zugabe von Poly A^+-RNS aus

Con A-Zellen; e ist der Gelstreifen einer anderen Elektrophorese; er wurde nach der Fluorographie länger exponiert und zeigt, daß im RCS - nach Zugabe von Poly A^+-RNS aus n-Zellen - offensichtlich auch hochmolekulare Proteine synthetisiert wurden (Pfeile); f zeigt 3 MG-Standards: $67x10^3$D, $45x10^3$D und $25x10^3$D. Die Unterschiede in a und b sind durch Pfeile gekennzeichnet. Der "Con-A-Streifen" (a) zeigt eine schwache zusätzliche Bande im höhermolekularen Bereich, während im niedermolekularen Bereich eine Bande fehlt, die im "n-Streifen" (b) vorhanden ist.

3.6. Filterhybridisierung mit polysomaler RNS aus n- und Con A-Zellen

Wenn in Con A-behandelten Zellen "Con A-spezifische" RNS vermehrt - oder neu - synthetisiert wird, müßte es möglich sein, diese RNS-Sequenzen mit der folgenden Hybridisierungsmethode als Banden auf einem Ma-DNS-Filter nachzuweisen.

Ma-DNS wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt und mit Hilfe der Southern-Technik auf ein Nitrocellulosefilter übertragen. Das auf diese Weise mit Ma-DNS belegte Filter wurde mit markierter, polysomaler RNS aus Zellen, die 60 Min. mit Con A behandelt waren, hybridisiert (2.9.2.).

Wenn nach Con A-Behandlung spezifische Sequenzen vermehrt transkribiert werden und somit ihre relative Häufigkeit in der RNS-Population größer ist, sollten in der Autoradiographie nach der Hybridisierung stärker markierte Bereiche oder Banden auftreten, da die häufiger vorhandenen RNS-Sequenzen schneller hybridisieren.

Hybridisiert man die Filter-gebundene DNS mit markierter polysomaler RNS aus Con A-Zellen, die mit unmarkierter RNS aus unbehandelten Zellen kompetiert ist, dann sind Banden nur dann zu erwarten, wenn die markierte Con A-RNS Sequenzen enthält, die in der n-RNS-Population nicht oder nur sehr

selten vorkommen. Dieser Schluß ist allerdings nur zulässig, wenn die Kompetitionsbedingungen ausreichend sind. Die Abb. 22 zeigt das autoradiographische Ergebnis verschiedener Hybridisierungsexperimente: In a wurde mit markierter polysomaler n-m RNS hybridisiert; das Filter zeigt über dem gesamten DNS-Bereich, wie zu erwarten, eine gleichmäßige Hybridisierung, nur die ribosomale Bande tritt verstärkt auf. In b wurde mit derselben RNS, die jedoch im Verhältnis 1:30 mit kalter Gesamt-Plasma-RNS vermischt war, hybridisiert; die ribosomale Bande verschwindet, die Hybridisierung ist insgesamt schwächer, so daß der Filmstreifen insgesamt etwas heller erscheint. Die Kompetierung war also für die ribosomale Bande ausreichend, was nicht verwundert, da der weitaus größte Anteil der Plasma-RNS r RNS ist. In c wurde mit markierter polysomaler Con A-m RNS hybridisiert; es treten neben der ribosomalen Bande 5 weitere Banden auf. In d und e wurde wie in c hybridisiert, jedoch war die Con A-m RNS 1:15 (in d) bzw. 1:30 (in e) mit unmarkierter polysomaler n-m RNS kompetiert. In beiden Fällen sind die Filter deutlich heller, was auf eine effektive Kompetition im m RNS-Bereich hinweist; dennoch bleiben sogar in e mindestens noch 2 Banden erhalten.

Daß die ribosomale Bande trotz der Kompetierung nur wenig schwächer wird, liegt vor allem daran, daß der r RNS-Anteil in der zur Kompetierung verwendeten polysomalen n-m RNS viel geringer ist als in der Gesamt-Plasma-RNS (vgl. b). Als Molekulargewichtsstandards sind in f die Banden eines Eco RI - Verdaus von λ - DNS dargestellt.

Insgesamt wurde mit der Hybridisierungstechnik also erreicht, daß tatsächlich Unterschiede zwischen der RNS aus Con A-Zellen und unbehandelten Zellen deutlich gemacht werden konnten.

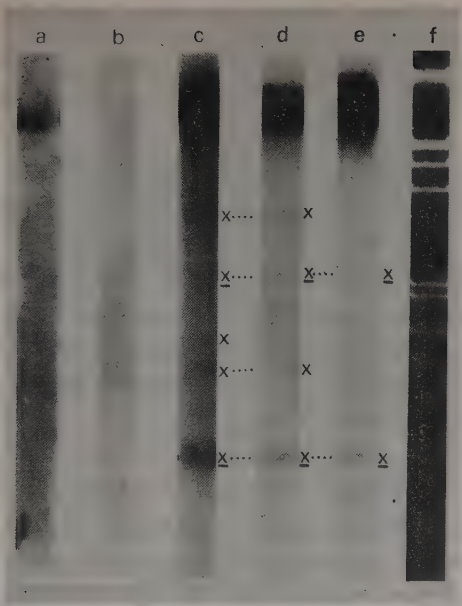


Abb. 22: sind die autoradiographischen Ergebnisse der Filterhybridisierungen (siehe Text) wiedergegeben. "x" und "x": spezifische Banden, die auftreten, wenn mit RNS aus Stylonychia-Zellen hybridisiert wurde, welche 1 h lang mit Concanavalin A behandelt waren. Zwei dieser Banden (mit "x" bezeichnet) bleiben sogar trotz 30facher Kompetition (e) mit unmarkierter RNS aus unbehandelten Zellen sichtbar.

Die Hybridisierungsexperimente konnten von vorneherein allerdings nur dann erfolgversprechend sein, wenn die spezifische Aktivität der RNS genügend hoch war, vor allem deshalb, weil sich die Aktivität nicht auf eine gereinigte m RNS-Sequenz konzentrierte, sondern auf das ganze Spektrum der "angereicherten" polysomalen m RNS verteilt war.

Es wurden deshalb zwei methodisch verschiedene Markierungen durchgeführt: in einigen Fällen wurde die RNS mit ^{32}P markiert, in den restlichen jedoch mit ^{125}J jodiert. Mit der ^{32}P-Markierung erreichte man eine spezifische Aktivität von ca. $1x10^6$ cpm/µg RNS. Hybridisierungen mit dieser RNS ergaben zwar gute ribosomale, aber keine sonstigen Banden. Nur die mehr als 100fach höhere spezifische Aktivität der jodierten RNS führten zu den dargestellten Ergebnissen.

4. Diskussion

A.

Im Gegensatz zur DNS und zum Chromatin liegen für die RNS von Stylonychia bis jetzt nur wenige, vor allem die r RNS betreffende Daten vor. Um Stylonychia auch an Hand der RNS mit anderen Organismen vergleichen zu können bzw. um weitere Information über die Genomorganisation und -expression zu erhalten, wurde die Kern- und Plasma-RNS durch MG-Bestimmungen näher charakterisiert. Voraussetzung dafür war eine nicht-degradierte RNS.

Geht man davon aus, daß der bei niederen Actinomycin D-Konzentrationen nicht auftretende Peak mit $2{,}1 \times 10^6$D Molekulargewicht die Vorstufe der r RNS repräsentiert, so zeigt dies, daß zumindest diese dargestellte Kern-RNS-Species undegradiert ist, da die zugehörige Doppelstrang-DNS ein MG von $4{,}5 \times 10^6$D hat (LIPPS und STEINBRÜCK, 1978); pro DNS-Strang werden demnach ca. $0{,}15 \times 10^6$D nicht transkribiert. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit den Daten für Oxytricha (PRESCOTT und MURTI (1973): 2×10^6D bzw. 34S; vgl. hierzu LAUTH et al., 1976). In Euplotes fand LIPPS (1974) einen r RNS-Precursor mit $2{,}8 \times 10^6$D und in Tetrahymena wiesen POUSADA et al. (1975) einen Precursor ähnlicher Größe (39S) nach und diskutieren in diesem Zusammenhang ein im Vergleich mit höheren Eukaryonten vereinfachtes Processing der r RNS, was auch bei Stylonychia zutreffen dürfte.

Allgemein findet man bei "niederen Eukaryonten" und Pflanzen einen Precursor vergleichbarer Größe (PERRY, 1976: ca. $2{,}7 \times 10^6$D; TABER und VINCENT, 1969: $2{,}3 \times 10^6$D; GRIERSON und HEMLEBEN, 1977: $2{,}1 \times 10^6$D), während die MG bei Vögeln und Säugern ca. $4{,}5 \times 10^6$D bzw. 45S betragen.

Schließt man vom r RNS-Precursor auf die restliche Kern-RNS, so dürfte das Elektropherogramm in Abb. 13 bzw. 15 im wesentlichen ebenfalls den undegradierten Zustand dieser RNS

wiedergeben, zumal das daraus ermittelte mittlere MG von $1,5 \times 10^6$D wiederum gut mit den DNS-Daten (LIPPS und STEINBRÜCK, 1978) übereinstimmt.

Während in Säugerzellen die Kern-RNS im Durchschnitt mindestens 4-5 (max.50) mal größer ist als die Plasma-RNS (PERRY, 1976), findet man bei dem niederen Pilz Achlya keinen Grössenunterschied mehr (TIMBERLAKE, 1977).

Stylonychia liegt mit einer Kern-RNS, die im Durchschnitt dreimal größer als die Plasma-RNS ist, zwischen diesen beiden Extremen, ähnlich wie Seeigel-Embryos (PERRY (1976): 2-3 mal größere KERN-RNS) und Drosophila mit einer Poly A^+-Kern-RNS, die auch nur die 2-3fache Plasma-RNS-Größe erreicht (LEVY et al., 1976).

Mit $0,4-0,5 \times 10^6$D ist das durchschnittliche MG der Plasma-RNS von Stylonychia dem von Dictyostelium (LODISH, 1977) und dem von Drosophila (s.o.) bzw. anderen Eukaryonten ähnlich; das etwas höhere MG der plasmatischen Poly A^+-RNS ($0,6 \times 10^6$D) ist eher mit der Poly A^+-RNS von Achlya (s.o.) zu vergleichen. Bei höheren Pflanzen, z.B. bei Matthiola, hat diese RNS-Species ein MG von $0,4 \times 10^6$D (GRIERSON und HEMLEBEN, 1977).

Obwohl ein Poly-A^--RNS-Anteil in der Gesamt-m RNS von Stylonychia nicht gesondert nachgewiesen wurde, kann man indirekt auf die Existenz einer solchen RNS-Fraktion schließen, wenn man die in 3.1.3. (Abb. 4) erwähnten Markierungsunterschiede zwischen Poly A^+- und Gesamt-Plasma-RNS (letztere nach Actinomycin D-Behandlung) beachtet. Im Bereich von 0,1-$0,22 \times 10^6$D bzw. in den Bereichen um $0,44 \times 10^6$D deutet nämlich die im Vergleich zur Poly A^+-RNS relativ stärkere Markierung der Gesamt-Plasma-RNS darauf hin, daß noch eine weitere RNS-Fraktion, also eine Poly A^--RNS, vorhanden sein muß. Stylonychia besitzt demnach offensichtlich, wie andere Eukaryonten auch, im Bereich von $0,1-0,22 \times 10^6$D (Histon-m-RNS-Bereich), aber auch in höheren MG-Bereichen außer der r RNS noch weitere Poly A^--RNS. (z.B. MILCAREK et al., 1974; NEMER et al., 1975; FROMSON und VERMA, 1976).

Von der gesamten Plasma-RNS entfallen 0,9-1,4% auf die Poly A^+-RNS, damit liegt Stylonychia zwischen den Werten, die (z.B.) für Xenopus (ROSBASH und FORD, 1974: 0,7-1%) und Dictyostelium (FIRTEL und JACOBSON, 1977: 1,5-3%) ermittelt wurden. Bei Achlya liegt der Anteil bei 2,6% (ROZEK et al., 1978).

Der Polyadenylsäurerest umfaßt bei Stylonychia im Mittel 120 Basen. Die Werte für höhere Eukaryonten (z.B. HeLa- und Maus-Sarcoma-Zellen) liegen bei 150-200 Basen (BRAVERMAN, 1974), für Dictyostelium bei 125 (FIRTEL und JACOBSEN, 1974) und für Tetrahymena bei ca. 100 Basen, entsprechend einem S-Wert von 4-5 (RON et al., 1976).

In Hefen liegt die Größe bei 50 Nucleotiden (McLAUGHLIN et al. 1973), während sie bei manchen Bakterien noch 45 (z.B. E. coli; NAKAZATO et al., 1975) bzw. 15-50 umfaßt (z.B. Caulobacter cr.; OHTA et al., 1975).

B.
Im Vergleich zum Mikronucleus beinhaltet der Makronucleus von Stylonychia hinsichtlich der Komplexität ein vereinfachtes Genom. Trotz der damit verbundenen Material- und Energieeinsparung bei der Bildung dieses, vor allem die vegetativen Zellfunktionen steuernden Kernes (vergl. STEINBRÜCK, 1976), erscheint ein zusätzlicher "Arbeitskern" vor allem nur dann sinnvoll, wenn damit eine erhöhte Effizienz dieses Genoms verbunden ist. Die daraus abgeleitete Vermutung, daß deshalb der exprimierte Anteil höher als bei normalen eukaryontischen Genomen ist, wurde mit Hilfe von Hybridisierungsexperimenten überprüft.

Zu den in 3.3. dargestellten Ergebnissen dieser Sättigungshybridisierungen muß allerdings bemerkt werden, daß die 40 bzw. 60% (bei asymmetrischer Transkription) der Doppelstrang-DNS-Sequenzen, denen die Plasma- bzw. die Kern-RNS-Sequenzen entsprechen, als Minimalwerte anzusehen sind.

Es kann nämlich nicht ausgeschlossen werden, daß in höheren, nicht mehr erfaßten Erot-Bereichen RNS-Sequenzen hybridisieren, deren Vorkommen in den Zellen - verglichen mit der hybridisierten RNS - viel seltener ist. Weiterhin werden mit diesen DNS-Sequenzen solche nicht berücksichtigt, die möglicherweise nur bei Konjugationsvorgängen (Makronucleusneubildung etc.) bzw. bei der Cystenbildung benötigt werden und deshalb in Normalkulturen nicht aktiv sind. Zu den errechneten Erot-Werten ist zu sagen, daß bei der zur Hybridisierung verwendeten Plasma-RNS die r RNS-Kontamination nicht berücksichtigt wurde, sie beeinflußt jedoch den hybridisierbaren DNS-Anteil nicht (vergl. HOUGH et al., 1975).

Auf Grund der Hybridisierungsergebnisse und der oben dargestellten RNS-Daten kann man sich zwei Extremfälle für die Transkription der im Makronucleus (Ma) enthaltenen 10^4Chromatin- bzw. DNS-Stücke (vergl. KLOETZEL, 1970; AMMERMANN, 1971; LIPPS und STEINBRÜCK, 1978; LIPPS et al., 1978) vorstellen:

1.: Alle DNS-Stücke des Ma werden transkribiert, aber von jedem Stück (durchschnittlich) nur 60% der Sequenzen.

2.: Es werden nur 60% aller DNS-Stücke transkribiert, jedoch immer die ganze Sequenz.

Geht man von der ersten Annahme aus, dann kann man mit den vorliegenden Kern-RNS-Daten auch die zwar seltenen, aber relativ hohen MG der Ma-DNS erklären: Nimmt man das höchste MG der Kern-RNS (ca. $3{,}8 \times 10^6$D=60% des zugehörenden DNS-Stükkes), so erhält man für die entsprechende Doppelstrang-DNS ein MG von $12{,}6 \times 10^6$D, was mit den Daten von LIPPS und Steinbrück (1978) gut übereinstimmt.

Berechnet man nach der ersten Annahme jedoch das ø MG der gesamten Ma-DNS, ausgehend vom ø MG der Kern-RNS ($1{,}5 \times 10^6$D), erhält man ein mittleres DNS (-Doppelstrang-) MG von 5×10^6D.

Dies widerspricht den Daten von LIPPS und STEINBRÜCK (: Ø DNS-MG = $3x10^6$D) und macht die 1. Möglichkeit für den Durchschnitt aller Fälle unwahrscheinlich.

Für die 2. Möglichkeit ergibt diesselbe Rechnung ein Ø DNS-MG von $3x10^6$D, was mit den DNS-Daten übereinstimmt und zugleich auch die Anzahl der schon erwähnten Chromatin- bzw. DNS-Stücke bestätigt ($3x10^{10}$D*/$3x10^6$D = $1x10^4$). Allerdings würden von diesen nur 60% (= 6000 Stücke) transkribiert werden.

Die 2. Annahme spricht gegen einen größeren Umfang von Spacer-Sequenzen, immerhin wäre aber ein Anteil von etwa 10% noch gut mit dem durchschnittlichen MG von DNS bzw. Kern-RNS zu vereinbaren.

Fragt man danach, wie die Strukturgene auf den DNS-Stücken verteilt sind, so ergibt die Rechnung für 1 Gen (= 1 Plasma-RNS-Sequenz mit Ø MG von $0,5x10^6$D) pro transkribiertem DNS-Stück nur 20% der Gesamtkomplexität ($0,5x10^6$D$x6x10^3$ = $0,30x10^{10}$D = 20% der Gesamtkomplexität). Da die Hybridisierung jedoch 40% erbrachte, müßten auf einem DNS-Stück im Durchschnitt der Fälle 2 (verschiedene) Gene liegen.

Zum selben Ergebnis gelangt man, wenn man die 20% Sequenzdifferenz (zwischen Kern- und Plasma-RNS) von der Kern-RNS-Sequenz abzieht. Der Kern-RNS verbleiben im Ø dann noch $1x10^6$D für reine Strukturgensequenzen, was wiederum für zwei Gene ausreicht. Diese Berechnungen beruhen allerdings auf einem der zwei möglichen Extremfälle (s.o.), so daß man die folgerichtigen "polycistronischen" DNS- bzw. Kern-RNS-Stücke sicher nicht allgemein fordern, wohl aber als möglich in Betracht ziehen kann. Der Nachweis solcher DNS-Stücke könnte elektronenmikroskopisch und mit Hilfe der R-Loop-Technik (m-RNS-Hybridisierung an Ma-DNS) gelingen, wenn ihr Vorkom-

---

* Die kinetische Komplexität der Ma-DNS beträgt $3x10^{10}$D (STEINBRÜCK, 1976)

men im Genom nicht zu selten ist. Die entsprechenden Kern-RNS-Stücke müßten durch Hybridisierung mit c-DNS zu finden sein. Im Falle eines positiven Nachweises wäre es zwar immer noch möglich, daß mehrere g l e i c h e Gene auf demselben DNS- oder Kern-RNS-Stück liegen, allerdings würde dies dann im Widerspruch dazu stehen, daß im Ma keine repetitiven Sequenzen nachzuweisen sind (STEINBRÜCK, 1976).

In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß MELLI et al. (1977) von einem polycistronischen Precursor für Histongene in HeLa-Zellen berichten und CRAWFORD et al. (1979) einen solchen im Hühnchengenom nicht ausschließen. Mit dem mittleren MG der Plasma-RNS (= m-RNS nach 3.1.2.) und deren 40% Sequenzhomologie zur DNS läßt sich die Mindestanzahl der Strukturgene im Ma berechnen: Sie beträgt $1,2\text{-}1,5\times10^4$ (40% der Ma-Einzelstrang-Komplexität sind $0,6\times10^{10}$ D; $0,6\times10^{10}$ D/4 bzw. 5×10^5 D = $1,2\text{-}1,5\times10^4$).

Dieser, wie auch den vorigen Berechnungen liegt die Annahme zugrunde, daß die Transkription asymmetrisch, d.h. nur von einem Strang geschieht. Zumindest bei den Histongenen von Drosophila konnten LIFTON et al. (1977) jedoch einen davon abweichenden Fall demonstrieren.

Die Tabelle III zeigt einen Vergleich der Hybridisierungsdaten von Stylonychia mit denen einiger anderer Organismen:

Tabelle III

Species	%Genom-Expression in Kern-RNS	cytopl.RNS	Gen-Anzahl ($x10^4$)	Ref.
HeLa	-	2	3	1.
Maus		2,8	3,6	1.
neugeboren	16	-	-	2.
transform.	36 (max.)	-	-	2.
Leber	8	-	-	3.
Xenopus oocyt.	1,2	-	1,5	3.
Strongyloc.	28*	~ 2	~ 1,5	4.5.
Drosophila	20	2,7	0,2 0,7	1. 6.
Dictystelium	19+	7,5	1,6	7.
Achlya	7	7	0,2	8.
Hefe	20	~ 20	~ 0,4	9.
Stylonychia	60 (min.)	40 (min.)	1,2-1,5 (min.)	

1. LEWIN (1975); 2. GRADY u. CAMPBELL (1973); 3. DAVIDSON u. BRITTEN (1973); 4. HOUGH et al. (1975); 5. DAVIDSON (1976); 6. LEVY et al. (1976); 7. FIRTEL u. JACOBSON (1977); 8. TIMBERLAKE u. SHUMARD (1977); 9. HERFORD u. ROSBASH (1977).

+ Der Wert berücksichtigt nur den Anteil, der in allen Entwicklungsstadien transkribiert wird.

* Der Wert repräsentiert die Summe der in verschiedenen Entwicklungsstadien aktivierten DNS-Doppelstrang-Sequenzen.

Der Vergleich macht deutlich, daß Stylonychia (neben dem Mikronucleus-Genom, welches mit dem typischen Eukaryonten-Genom zu vergleichen ist) im Makronucleus tatsächlich ein sehr effektives "Arbeitsgenom" besitzt.

C.
Unter normalen Umständen kommt Stylonychia nie mit Con A in Berührung, aber dennoch löst der "zufällige" Effekt der allgemeinen funktionellen Zerstörung der Pellicula u.a. die für jede Ciliatenzelle normalen Vorgänge der Zellwandneusynthese aus. Außerdem verlaufen diese Vorgänge in allen Zellen einer Kultur ziemlich gleichzeitig, so daß "Con A-Kulturen" im Hinblick auf viele Syntheseleistungen synchrone Kulturen sind.

Von den Versuchsergebnissen nach Con A-Behandlung, die in 3.4. - 3.6. dargestellt sind, lassen sich die Veränderungen des Proteinmusters und die Hybridisierungsexperimente am besten reproduzieren, obwohl gerade bei letzteren die Bedingungen noch verbesserungsfähig sind, insofern, als man die Gelstreifen mit mehr und dafür denaturierter DNS beladen kann. Außerdem wäre die Hybridisierung mit spezifisch hochmarkierter c-DNS (anstelle der RNS) möglicherweise effektiver und die Ergebnisse entsprechend besser (stärkere Banden). Ob die verstärkte (bzw. neue) und die abgeschwächte (bzw. verschwundene) Proteinbande im Muster des RCS (Abb. 21) mit 2 entsprechenden Banden des in vivo-Systems (Abb. 20) zu homologisieren sind, wurde nicht untersucht. Im Folgenden wird deshalb von den in vitro-Translationsversuchen (3.5.) nur die Tatsache verwertet, daß offensichtlich Unterschiede zwischen "normal-RNS" und "Con A-RNS" bestehen, was die Ergebnisse der Hybridisierungsversuche (3.6.) bestätigt. Zusammen mit den erwähnten Proteinveränderungen und den von KNOWLES et al. (1978) beschriebenen Ergebnissen von Injektionsversuchen berechtigt dies zu dem Schluß, daß nach einer Con A-Behandlung Gene aktiviert werden und als Folge davon 60 Min. nach der Behandlung in Stylonychia-Zellen spezifische RNS-Sequenzen auftreten. Da man einige Zeit danach auch Änderungen im Proteinmuster nachweisen kann, muß es sich um m-RNS handeln.

Die Frage, ob die Gene, die dieser RNS zugrunde liegen, neu angeschaltet oder "nur" (spezifisch-)verstärkt transkribiert

werden, kann nicht beantwortet werden. Eine (Gen-)Regulation liegt aber in jedem Falle vor, und dies ist genügend Anlaß dafür, an diesem (Con A-)Beispiel und am selben Objekt weitere Untersuchungen über die transkriptionskontrollierte Genexpression vorzunehmen, zumal noch weitere Gründe dafür sprechen:

So ist, wie die Filterhybridisierungsexperimente zeigen, die Identifizierung spezifischer Gene bzw. deren DNS möglich. Eine Anreicherung dieser DNS erscheint damit schon im Agarosegel als durchführbar. Außerdem ist eine Anreicherung bzw. Vervielfältigung dieser DNS mit Hilfe der Clonierungstechnik im Falle von Stylonychia besonders vorteilhaft, da das Makronucleusgenom verhältnismäßig klein (12xE. coli; STEINBRÜCK, 1976) und schon in Einzelstücke mit relativ niedermolekularer DNS gegliedert ist (LIPPS et al., 1978). Zusätzlich bietet die Zellgröße von Stylonychia einen weiteren Vorteil, denn sie macht Injektionsversuche bzw. Kerntransplantationen möglich, so daß gleichzeitig ein homologes Testsystem zur Verfügung steht.

5. Zusammenfassung

Zunächst wurde RNS sowohl aus dem gesamten Cytoplasma wie auch aus der Polysomenfraktion und aus gereinigten Makronuclei isoliert.

Weiterhin wurden die durchschnittlichen Molekulargewichte ermittelt, welche für die Plasma-RNS (ohne r RNS) $4-5 \times 10^5$ D und für die Makronucleus-RNS (ohne r RNS-Precursor) $1{,}5 \times 10^6$ D betragen.

Das Molekulargewicht des r RNS-Precursors liegt bei $2{,}1 \times 10^6$ D, was einerseits für den Vorläufer der cytoplasmatischen r RNS, deren Molekulargewichte bei $0{,}7 \times 10^6$ D und $1{,}3 \times 10^6$ D liegen, ausreicht und andererseits sehr gut mit dem bekannten r DNS-Molekulargewicht von $4{,}5 \times 10^6$ D (für die Doppelstrang-DNS) übereinstimmt.

Die Poly A^+-RNS, deren Anteil an der Gesamt-Plasma-RNS 0,9-1,4% beträgt, wurde angereichert und die Größe ihrer Poly A-Sequenz bestimmt. Im Mittel umfaßt diese 120 Basen, was einem Molekulargewicht von $3{,}9 \times 10^4$ D entspricht.

Außerdem wurde mit Hilfe von Sättigungshybridisierungen im RNS-Excess festgestellt, daß - asymmetrische Transkription vorausgesetzt - in Normalkulturen (ohne Konjuganten) mindestens 60% der Makronucleus-DNS-Sequenzen transkribiert werden und mindestens noch 40% in der plasmatischen RNS repräsentiert sind. Die Effizienz des Makronucleusgenoms ist somit größer als die aller bisher untersuchten eukaryontischen Genome.

Auf Grund der ermittelten Daten wurden im Anschluß daran zwei Möglichkeiten für die Transkription der DNS-Stücke bzw. der gene sized pieces und das Vorkommen von "polycistronischer" DNS im Makronucleus diskutiert.

Eine Berechnung der Genanzahl ergab für Stylonychia einen Mindestwert von 12 000 - 15 000 Genen.

Schließlich bestätigten die Versuche mit den Concanavalin A-behandelten Zellen frühere Ergebnisse (vergl. KNOWLES et al., 1978) insofern, als das Vorhandensein von spezifischen RNS-Sequenzen in der m RNS dieser Concanavalin A-behandelten Stylonychiazellen in dreifacher Weise abgesichert werden konnte:

1. Es treten nach der Concanavalin A-Behandlung Unterschiede im Gesamtproteinmuster auf,

2. werden im Reticulocytensystem mit der RNS aus Concanavalin A-behandelten Zellen bzw. mit der RNS aus unbehandelten Zellen unterschiedliche Proteine synthetisiert und

3. zeigen Filterhybridisierungen, daß die m RNS aus Concanavalin A-behandelten Zellen mindestens 5 spezifische Sequenzen aufweist, die auf dem mit Makronucleus-DNS belegten Filter als Banden sichtbar werden.

Angesichts der Genaktivierung, die offensichtlich als Folge der Con A-Behandlung stattfindet und auf Grund der Identifizierungsmöglichkeit von spezifischen Genen bzw. ihrer DNS mit Hilfe der RNS-Hybridisierungstechnik, wird abschließend noch auf weitere Vorteile hingewiesen, die deutlich machen, warum gerade das Makronucleusgenom von Stylonychia für eingehendere Untersuchungen an der Genregulation und Genexpression besonders geeignet ist.

6. Abkürzungen

ATP	Adenosin-5'-triphosphat·Na_2-Salz
BP	Bindungspuffer
^oC	Temperatur in Grad Celsius
Ci	Curie
cm	Zentimeter
cm^3	Kubikzentimeter
Con A	Concanavalin A
Con A-Zellen	Stylonychia mytilus-Zellen, die mit Concanavalin A behandelt wurden
Cot	Produkt aus der DNS-Anfangskonzentration C_o in Mol pro l und der Zeit t in Sekunden
cpm	gezählte radioaktive Zerfälle pro Minute
CTA	Cetyl-trimethyl-ammoniumbromid
CTP	Cytidin-5'-triphosphat·Na_2-Salz
D	Dalton (= die Masse eines Wasserstoffatoms $=1,67 \times 10^{-12}$g
DNase	Desoxyribonuclease
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DPA	Diphenylamin
x E	Vielfaches der Kunitzeinheit (Maß für die Enzymaktivität (siehe:U)
E. coli	Escherichia coli (Bakterium)
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EK	Endkonzentration
Erot	Äquivalent-Rot (s.Rot)
FA	Formamid
FA-PAA	Formamid-Polyacrylamid
g	Gramm oder Vielfaches der Erdbeschleunigung
GTP	Guanosin-5'-triphosphat·Na_2-Salz
h	Stunde(n)
HAP	Hydroxyapatit
K^+EDTA	Kaliumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure
LSB	niederioniger Puffer (Low Salt Buffer)
M	Molar
mA	Milliampere

Ma	Makronulceus
mCi	Millicurie
µCi	Mikrocurie
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MG	Molekulargewicht
Min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
mmol	Millimol
m RNS	Messenger RNS
NaAc	Natriumacetat
NaAs	Natriumaminosalycilat
nm	Nanometer
n-Zellen	Stylonychia mytilus-Zellen, die nicht mit Concanavalin A behandelt wurden
Ø	Durchschnitt/durchschnittlich
OD	Optische Dichte
Oligo dT	Oligodesoxythymidylsäure
PAA	Plyacrylamid
Poly A^+-m RNS	Messenger RNS mit einem Polyadenylsäureende
Poly A^--m RNS	Messenger RNS ohne Polyadenylsäureende
Poly U	Polyuridylsäure
PVS	Polyvinylsulfat
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RCS	Reticulozytensystem
r DNS	Desoxyribonucleinsäure-Sequenz, die die Gene für die ribosomale RNS beinhaltet
RNS	Ribonucleinsäure
Rot	Produkt aus der RNS-Anfangskonzentration R_o in Mol pro l und der Zeit t in Sekunden
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
r RNS	ribosomale RNS
x S	Vielfaches des Sedimantationskoeffizienten
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden

SSC	Standard Saline Citrate = 0,15M NaCl; 0,015M Natriumcitrat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
t RNS	Transfer RNS
x U	Vielfaches der Kunitzeinheit (Maß für die Enzymaktivität (siehe: E)
V	Volt
Vol	Volumen (Volumina)

7. Literaturverzeichnis

AMMERMANN, D. (1965): Cytologische und genetische Untersuchungen an dem Ciliaten Stylonychia mytilus Ehrenberg. Arch. Protistenk. 108, 109 - 152

AMMERMANN, D. (1971): Morphology and Development of the Macronuclei of the Ciliates Stylonychia mytilus and Euplotes aediculatus. Chromosoma (Berl.) 33, 209 - 238

AMMERMANN, D., G. STEINBRÜCK, L. v. BERGER and W. HENNIG (1974): The Development of the Macronucleus in the Ciliated Protozoan Stylonychia mytilus. Chromosoma (Berl.) 45, 401 - 429

AVIV, H. and Ph. LEDER (1972): Purification of Biologically Active Globin Messenger RNA by Chromatography on Oligothymidylic-acid-Cellulose. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69, 1408 - 1412

BELLAMY, A.R. and R.K. RALPH (1968): Recovery and Purification of Nucleic Acids by Means of Cetyltrimethylammonium Bromide. In: Methods Enymol. XII B., 156 - 160, Ed. by L. GROSSMANN and K. MOLDAVE, Academic Press Inc.,New York.

BERNARDI, G. (1965): Chromatography of Nucleic Acids on Hydroxyapatite. I. Nature 206, 779 - 783

BERRIDGE, M.V., S.R. FARMER, C.D. GREEN, E.C. HENSHAW and J.R. TATA (1976): Characterization of Polysomes from Xenopus Liver Synthesizing Vitellogenin and Translation of Vitellogenin and Albumin Messenger RNA's in vitro. Eur. J. Biochem. 62, 161 - 171

BESSLER, W.G. and H.J. LIPPS (1976): Concanavalin A-induced Nuclear Division in Stylonychia mytilus. J. Gen. Microbiol. 92, 221 - 223

BONNER, W.M. and R.A. LASKEY (1974): A Film Detection Method for Tritium-Labelled Proteins and Nucleic Acids in Polyacrylamide Gels. Eur. J. Biochem. 46, 83 - 88

BRAVERMAN, G. (1974): Eukaryotic Messenger RNA.
Annu. Rev. Biochem. 43, 621 - 642

BRITTEN, R.J. and D.E. Kohne (1968): Repeated Sequences in DNA.
Science 161, 529 - 540

BRITTEN, R.J., D.E. GRAHAM, B.R. NEUFELD (1974): Analysis of Repeating DNA Sequences by Reassociation.
In: Methods Enzymol. 19, 363 - 406
Ed. by: L. GROSSMAN and K. MOLDAVE, Academic Preiss Inc., New York

BURTON, K. (1956): A Study of Conditions and Mechanism of the Diphenylamine Reaction for the Colorimetric Estimation of Deoxyribonucleic Acid.
Biochem. J. 62, 315 - 323

CRAWFORD, R.J., P. KRIEG, R.P. HARVEY, D.A. HEWISH and J.R. E. WELLS (1979): Histone genes are clustered with a 15-Kilo-base repeat in the chicken genome.
Nature 279, 132 - 136

DARNBROUGH, C., S. LEGON, T. HUNT and R.J. JACKSON (1973): Initiation of Protein Synthesis: Evidence for Messenger RNA-independent Binding of Methionyl-transfer RNA to the 40 S Ribosomal Subunit.
J. Mol. Biol. 76, 379 - 403

DAVIDSON, E.H. and R.J. BRITTEN (1973): Organization, Transcription and Regulation in the Animal Genome.
Q. Rev. Biol. 48, 565 - 613

DAVIDSON, E.H. (1976): RNA Sequence Complexity and Structural Gene Transcription in Early Embryos.
In: Gene Activity in Early Development, Sec. Ed.;Academic Press Inc. New York and London

DENIC, M., L. EHRENBERG, I. FEDORCSAK, F. SOLYMOSY (1970): The effect of diethylpyrocarbonate on the biological activity of messenger RNA and transfer RNA.
Acta Chem. Scand. 24, 3753 - 3755

ELSEVIER, S.M., H.J. LIPPS and G. STEINBRÜCK (1978): Histone Genes in Macronuclear DNA of the Ciliate Stylonychia mytilus.
Chromosoma (Berl.) 69, 291 - 306

FEDORSCÁK, I., A.T. NATARAJAN, L. EHRENBERG (1969): On the Extraction of Ribonucleic Acid with Template Activity from Barley Embryos Using Diethyl Pyrocarbonate as Nuclease Inhibitor.
Eur. J. Biochem. 10, 450 - 458

FIRTEL, R.A. and A. JACOBSON (1977): Structural Organization of the Genome of Dictostelium discoideum.
In: International Review of Biochemistry of Cell Differentiation II, 15, 377 - 429
Ed. by J. PAUL, University Press Baltimore

FRISCH, A., W. BESSLER, H.J. LIPPS and D. AMMERMANN (1976): Immobilization of Ciliates by Concanavalin A.
J. Protozool. 23, 427 - 430

FROMSON, D. and D.S. VERMA (1976): Translation of nonpolyadenylated messenger RNA of sea urchin embryos.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 73, 148 - 151

GALAU, G.A., R.J. BRITTEN and E.H. DAVIDSON (1974): A Measurement of the Sequence Complexity of Polysomal Messenger RNA in Sea Urchin Embryos.
Cell 2, 9 - 20

GILES, K.W. and A. MYERS (1965): A Improved Diphenylamine Method for the Estimation of Deoxyribonucleic Acid.
Nature, 206, 93

GILLESPIE, D. and S. SPIEGELMAN (1965): A Quantitative Assay for DNA-RNA Hybrids with DNA immobilized on a Membran.
J. Mol. Biol. 12, 829 - 842

GOLDBERG, R.B., G. HOSCHEK and J.C. KAMALAY (1978): Sequence Complexity of Nuclear and Polysomal RNA in Leaves of The Tabacco Plant.
Cell 14, 123 - 131

GRADY, L.J. and W.P. CAMPBELL (1973): Non-repetitive DNA Transcription in Mouse Cells grown in Tissue Culture.
Nature New Biol. 243, 195 - 198

GRIERSON, D. and V. HEMLEBEN (1977): Ribonucleic Acid from the higher Plant Matthiola incana.
Biochim. Biphys. Acta 475, 424 - 436

HAYWARD, G.S. and M.G. SMITH (1972): The Chromosome of Bacteriophage T 5.
J. Mol. Biol. 63, 383 - 395

HEREFORD, L.M. and M. ROSBASH (1977): Number and Distribution of Polyadenylated Sequences in Yeast.
Cell 10, 453 - 462

HILL, D.L. (1972): The Biochemistry and Physiology of Tetrahymena.
Academic Press New York and London

HOUGH, B.R., M.J. SMITH, R.J. BRITTEN, E.H. DAVIDSON (1975): Sequence Complexity of Heterogeneous Nuclear RNA in Sea Urchin Embryos.
Cell 5, 291 - 299

HUNT, T., G.A. VANDERHOFF and J.M. LONDON (1972): Control of Globin Synthesis: The Role of Heme.
J. Mol. Biol. 66, 471 - 481

JOST, J.-P. and G. PEHLING (1976): Organization of Vitellogenin Polysomes, Size of the m-RNA and Polyadenylate Fragment.
Eur. J. Biochem. 62, 299 - 306

JOST, J.-P. and G. PEHLING (1976): Immunochemical Isolation and Characterization of Vitellogenin m-RNA from Liver of Estradiol-Treated chicks.
Eur. J. Biochem. 339 - 346

KASTENMEIER, B. (1974): Die Ribonucleinsäuren des Ciliaten Stylonychia mytilus.
Zulassungsarbeit im Fachbereich Biologie der Universität Tübingen

KIRBY, K.S. (1968): Isolation of Nucleic Acids with Phenolic Solvents.
In: Methods Enzymol. 12, 87 - 99
Ed. by: L. GROSSMAN and K. MOLDAVE, Academic Press Inc., New York

KLEIMAN, L., G.D. BIRNIE, B.D. YOUNG and J. PAUL (1977): Comparison of the Base-Sequence Complexities of Polysomal and Nuclear RNAs in Growing Friend Erythroleukemia Cells.
Biochemistry 16, 1219 - 1223

KNOWLES, J.K.C., H.J. LIPPS, A. NOCK (1978): Translation of Homologous RNA Injected Into The Ciliate Stylonychia Mytilus.
Biochem.Biophys. Res. Commun. 80, 897 - 904

KOURILLSKY, Ph., J. LEIDNER and G.Y. TREMBLAY (1971): DNA-DNA-hybridisation on filters at low temperature in the prexence of formamide or urea.
Biochimie (Paris) 53, 1111 - 1114

LAEMMLI, U.K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T 4.
Nature 227, 680 - 685

LASKEY, R.A. and A.D. MILLS (1975): Quantitative Film Detection of ^{3}H and ^{14}C in Polyacrylamide Gels by Fluorography.
Eur. J. Biochem. 56, 335 - 341

LAUTH, M.R., B.B. SPEAR, J. HEUMANN, D.M. PRESCOTT (1976): DNA of ciliated protozoa: DNA sequence diminution during macronuclear development of Oxytricha.
Cell 7, 67 - 74

LEE, Y.C. and O.H. SCHERBAUM (1966): Nucleohistone Composition in Stationary and Division Synchronized Tetrahymena Cultures.
Biochemistry 5, 2067 - 2075

LEICK, V. (1969): Formation of Subribosomal Particles in Macronuclei of Tetrahymena pyriformis.
Eur. J. Biochem. 8, 221 - 228

LEONARD, N.J., J.J. McDONALD und M.E. REICHMANN (1970): Reaction of Diethyl-Pyrocarbonate with Nucleic Acid Components, I. Adenine.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 67, 93 - 98

LEVY, B.W., C.B. JOHNSON, B.J. McCARTY (1976): Diversity of Sequences in total and polyadenylated nuclear RNA from Drosophila cells.
Nucleic Acids Res. 3, 1777 - 1789

LEWIN, B. (1975): Units of Transcription and Translation: Sequence Components of Heterogeneous Nuclear RNA and Messenger RNA.
Cell 4, 77 - 93

LIFTON, R.P., M.L. GOLDBERG, R.W. KARP and D.S. HOGNESS (1977): The Organization of the Histone Genes in Drosophila melanogaster: Functional and Evolutionary Implications.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42, 1047 - 1051

LINDBERG, U. and T. PERSSON (1972): Isolation of m-RNA from KB-Cells by Affinity Chromatography on Polyuridylic Acid Covalently Linked to Sepharose.
Eur. J. Biochem. 31, 246 - 254

LIPPS, H.J. (1974): Die Oberflächenantigene bei dem hypotrichen Ciliaten Euplotes minuta und eine antiserumabhängige Makronukleus Degeneration.
Arch. Protistenk. 116, 106 - 131

LIPPS, H.J. and W. BESSLER (1977): Early Nuclear Events Following The Interaction Of The Ciliate Stylonychia Mytilus With The Plant Lectin Concanavalin A.
Cell Differ. 6, 187 - 197

LIPPS, H.J. and G. STEINBRÜCK (1978): Free Genes for r-RNA's in the Macronuclear Genome of the Ciliate Stylonychia mytilus.
Chromosoma (Berl.) 69, 21 - 26

LIPPS, H.J., A. NOCK, M. RIEWE and G. STEINBRÜCK (1978): Chromatin structure in the macronucleus of the ciliate Stylonychia mytilus.
Nucleic Acids Res. 5, 4699 - 4709

LODISH, H.F. (1977): Synthesis and Structure of Messenger RNA in the Slime Mold Dictyostelium Discoideum.
In: Cell Differentiation in Microorganisms, Plants and Animals, 126 - 145
Ed. by: L. NOVER and K. MOTHES, North Holland Publ. Comp. Amsterdamm, New York, Oxford.

LOENING, U.E. (1967): The Fractionation of High-Molecular-Weight Ribonucleic Acid by Polyacrylamid-Gel Electrophoresis.
Biochem. J. 102, 251 - 257

LOENING, U.E. (1968): Molecular Weights of Ribosomal RNA in Relation to Evolution.
J. Mol. Biol. 38, 355 - 365

LOENING, U.E. (1969): The Determination of the Molecular Weight of Ribonucleic Acid by Polyacrylamide-Gel Electrophoresis.
Biochem. J. 113, 131 - 138

MAIZELS, N. (1976): Dictyostelium 17 S, 25 S and 5 S 4-DNA's Lie within a 38000 Base Pair Repeated Unit.
Cell 9, 431 - 438

MANIATIS, T., A. JEFFREY and D.G. KLEID (1975): Nucleotide Sequence of the Rightward Operator of Phage λ .
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72, 1184 - 1188

MARTIN, T.E., F.S. ROLLESTON, R.B. LOW and J.G. WOOL (1969): Dissociation and Reassociation of Sceletal Muscle Ribosomes.
J. Mol. Biol. 43, 135 - 149

McLAUGHLIN, C.S., J.R. WARNER, A. EDMONDS, H. NAKAZATO, M.H. VAUGHAN (1973): Polyadenylic Acid Sequences in Yeast Messenger Ribonucleic Acid.
J. Biol. Chem. 248, 1466 - 1471

MELLI, M., G. SPINELLI, H. WYSSLING and E. ARNOLD (1977): Presence of Histon m-RNA Sequences in High Molecular Weight RNA of Hela Cells.
Cell 11, 651 - 661

MILCAREK, Ch., R. PRICE, S. PENMAN (1974): The Metabolism of a Poly (A) Minus m RNA Fraction in Hela cells.
Cell 3, 1 - 10

MORTON, B., C. NWIZU, E.C. HENSHAW, C.A. HIRSCH and H.H. HIATT (1975): The Isolation of Large Polysomes in High Yield from Unfractionated Tissue Homogenates.
Biochim. Biophys. Acta 395, 28 - 40

MURAMATSU, M. (1973): Preparation of RNA from Animal Cells.
In: Methods in Cell Biology VII, 23 - 51
Ed. by: D.M. PRESCOTT, Acad. Press New York and London

NAKAZATO, H., S. VENKATESAN, M. EDMONDS (1975): Polyadenylic acid sequences in E. coli messenger RNA.
Nature 256, 144 - 146

NEMER, M., L.M. DUBROFF and M. GRAHAM (1975): Properties of Sea Urchin Embryos Messenger RNA Containing and Lacking Poly A.
Cell 6, 171 - 178

NIESSLING, J. und C.E. SEKERIS (1971): Further Studies on Nuclear Ribonucleoprotein Particles Containing DNA-Like RNA from Rat Liver.
Biochim.Biophys. Acta 247, 391 - 403

OHTA, N., M. SANDERS, A. NEWTON (1975): Poly (Adenylic Acid) sequences in the RNA of Caulobacter crescentus.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72, 2343 - 2346

PARTHIER, B. (1974): Ribosomen und das System der Proteinsynthese.
In: Biochemische Cytologie der Pflanzenzelle, 41 - 70
Hrsg.: G. JACOBI, G. Thieme Verlag, Stuttgart

PENMAN, S. (1969): Preparation of Purified Nuclei and Nucleoli from Mammalian Cells.
In: Fundamental techiques in Virology 35 - 47
Ed. by: K. HABEL, N.P. SALZMAN, Academic Press, New York, London

PERRY, R.P. and D.E. KELLEY (1968): Persistent Synthesis of 5 S RNA when Production of 28 S and 18 S Ribosomal RNA is Inhibited by Low Doses of Actinomycin D.
J. Cell. Physiol. 72, 235 - 246

PERRY, R.P., J.L. TORRE, D.E. KELLY und J.R. GREENBERG (1972): On the lability of poly(A) sequences during extraction of messenger RNA from polyribosomes.
Biochim. Biophys. Acta 262, 220 - 226

PERRY, R.P., E. BARD, B.D. HAMES and D.E. KELLY (1975): Messenger RNA: Transkription, Processing and Turnover.
Proc. 9 th FEBS Meeting 33, 17 - 34

PERRY, R.P. (1976): Processing of RNA.
Annu. Rev. Biochem. 45, 605 - 629

PETROVIĆ, S., A. BECAREVIĆ, J. PETROVIĆ (1965): The isolation and stability of rapidly-labelled ribonucleic acids from rat-liver microsomes.
Biochim. Biphys. Acta 95, 518 - 521

PHARMACIA (1974): Broschüre zu: "Affinity Chromatography" Principles and Methods.
Herausgeber: Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden

POUSADA, C.R., L. MARCAUD, M.M. PARTIER and D.H. HAYES (1975): Rapidly Labelled RNA in Tetrahymena pyriformis.
Eur. J. Biochem. 56, 117 - 122

PRENSKY, W. (1976): The Radioiodination of RNA and DNA to High Specific Activities.
In: Meth. Cell. Biol. XIII.
Ed. by: D.M. PRESCOTT, Academic Press, New York

PRESCOTT, D.M. and K.G. MURTI (1973): Chromosome Structure in Ciliated Protozoans.
Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 38, 609 - 618

PRESCOTT, D.M., K.G. MURTI, C.J. BOSTOCK (1973): Genetic Apparatus of Stylonychia sp.
Nature 242, 576 , 597 - 600

RICHARDS, E.G. and W.B. GRATZER (1968): Disc Electrophoresis of RNA in Polyacrylamide Gels.
In: Chromatographic and Electrophoretic Techniques 419 - 437, Ed.by: J. SMITH, Medical books, LTD

RIEWE, M. (1979): Templateaktivität von Makro- und Mikronucleus-Chromatin des Ciliaten Stylonychia mytilus.
Dissertation im Fachbereich Biologie der Universität Tübingen

RON, A., O HOROVITZ and J. SAROV (1976): Fractionation of RNA from Tetrahymena by Affinity Chromatography on Poly-U-Sepharose.
J. Mol. Evol. 8, 137 - 142

ROSBASH, M. and P.J. FORD (1974): Polyadenylic-acid-containing RNA in Xenopus laevis Oocytes.
J. Mol. Biol. 85, 87 - 101

ROZEK, C.E., W.C. ORR, W.E. TIMBERLAKE (1978): Diversity and Abundance of Polyadenylated RNA from Achlyaambisexualis.
Biochemistry 17, 716 - 722

SCHAFFNER, W., K. GROSS, J. TELFORD, M. BIRNSTIEL (1976): Molecular Analysis of the Histone Gene Cluster of Psamechinus miliaris: II. The Arrangement of the Five Histones - Coding and Spacer Sequences.
Cell 8, 471 - 478

SCHEELE, G., B. DOBBERSTEIN and G. BLOBEL (1974): Transfer of Proteins across Membranes. Biosynthesis in vitro of Pretrypsinogen by Cell Fractions of Canine Pankreas.
Eur. J. Biochem. 82, 593 - 599

SCHERRER, K. and J.E. DARNELL (1962): Sedimentation Characteristics of Rapidly Labelled RNA from HeLa Cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 486 - 490

SCHERRER, K. (1969): Isolation and Sucrose Gradient Analysis of RNA.
In: Fundamental techniques in Virology, 413 - 432
Ed. by: K. HABEL, N.P. SALZMAN, Acad. Press, New York, London.

SCHLAEGER, R., D. HOFFMANN und H. HILZ (1969): Polyribosomes in Tumor Cells during Induction of Ribonuclease by Cytostatic Treatment.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 1017 - 1022

SOLYMOSY, F., J. FEDORCSÁK, A. GULYÁS, G.L. FARKAS und L. EHRENBERG (1968): A New Method Based on the Use of Diethyl Pyrocarbonate as a Nuclease Inhibitor for Extraction of Undegraded Nuclic Acid from Plant Tissues.
Europ. J. Biochem. 5, 520 - 527

SOUTHERN, E.M. (1975): Detection of Specific Sequences among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis.
J. Mol. Biol. 98, 503 - 517

STEINBRÜCK, G. (1976): Untersuchungen zur Organisation des Genoms von Stylonychia Mytilus (Ciliata).
Dissertation im Fachbereich Biologie der Universität Tübingen

TABER, R.L. and W.S. VINCENT (1969): The Synthesis and Processing of Ribosomal RNA Precursor Molecules in Yeast.
Biochim. Biophys. Acta 186, 317 - 325

TIMBERLAKE, W.E., D.S. SHUMARD and R.B. GOLDBERG (1977): Relationsship between Nuclear and Polysomal RNA Populations of Achlya: a Simple Eucaryotic System.
Cell 10, 623 - 632

VARENNE, S., M. PIOVANT, J.M. PAYÈS und C. LAZDUNSKI (1978): Evidence for Synthesis of Alkaline Phosphatase on Membrande-Bound Polysomes in Escherichia coli.
Eur. J. Biochem. 86, 603 - 606

WASILEWSKA, L.D. and K. KLECZKOWSKI (1976): Preferential Stimulation of the Plant m-RNA Synthesis by Gibberellic Acid.
Eur. J. Biochem. 66, 405 - 412

WIEGERS, U. und H. HILZ (1971): A New Method Using "Proteinase K" To Prevent m-RNA Degradation During Isolation From Hela Cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 513 - 519

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

D. Ammermann, M. Baumann, E. Bünning, G. Fritz, J. Gelinek, K.G. Grell, W. Hennig, W. Hewers, H. Krüger, D. Kummer, H.W. Leopoldt, O. Loehr, R.J. Lorenz, K. Mägdefrau, H. Mauser, H. Meier, H. Metzner, G. Mickoleit, F.P. Möhres, E. Müller, H. Naumer, D. Oelkrug, W. Rähle, A. Rieker, W. Rüdorff, E. Schwartz, V. Schwartz, W. Schweizer, B. Schwemmle, F. Seelig, W. Seyffert, D. Sperlich, H. Stegmann, F. Stöckmann, E. Stumpp, D. Varjú, W. Walter, K. Wegmann, G. Weizel, K. Wöhrmann, H. Zähner, K. Zetsche.

Lebenslauf

19. Juni 1947	Geboren in Bad Peterstal-Griesbach
1954 - 1959	Besuch der Volksschule in Bad Peterstal-Griesbach
1959 - 1967	Besuch des Gymnasiums der Heimschule-Lender in Sasbach bei Achern
Juni 1967	Abitur
1967 - 1968	Wehrdienst
WS 1968/69	Studium der Physik an der Universität Karlsruhe
1969 - 1975	Studium der Biologie und Chemie an der Universität Tübingen
Januar 1974	Staatsexamen in Chemie
November 1974	Staatsexamen in Biologie
1974 - 1975	Staatsexamensarbeit bei Herrn Professor Ammermann am Institut für Biologie III, Abt. Zellbiologie, der Universität Tübingen. Thema der Arbeit: "Der Einfluß von Actinomycin D und α - Amanitin auf die Synthese von ribosomaler- und Kern-RNS bei dem Ciliaten Stylonychia mytilus"
1976 - 1979	Doktorand bei Herrn Professor Ammermann am selben Institut. Thema der Arbeit: "Untersuchungen zur RNS des Ciliaten Stylonychia mytilus".
1977	Eheschließung